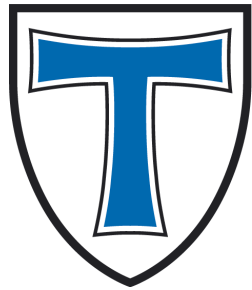


JUSTUS-LIEBIG-



UNIVERSITÄT GIESSEN

Rudolf-Buchheim Institut für Pharmakologie

Untersuchung der humanen Coronavirus-induzierten Wirtsreaktion auf mRNA- und Proteomebene

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. Nat.)

angefertigt am Fachbereich Für Biologie und Chemie

vorgelegt von Michael Poppe

Gießen, 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann (JLU Gießen)
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht (JLU Gießen)

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Michael Poppe)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 ZUSAMMENFASSUNG / <i>SUMMARY</i> | 1 |
| 1.1 Zusammenfassung | 1 |
| 1.2 summary | 3 |
| 2 EINLEITUNG | 5 |
| 2.1 Coronaviren | 5 |
| 2.1.1 Coronavirus Phylogenie, Struktur und Genom | 6 |
| 2.1.2 Coronavirus Replikationszyklus | 7 |
| 2.2 Coronavirus induzierte zelluläre Signalwege | 9 |
| 2.2.1 ER Stress Signalweg | 10 |
| 2.2.2 IL-1 Signalweg | 14 |
| 2.3 mRNA Abbaumechanismen | 18 |
| 2.3.1 <i>P-bodies</i> | 20 |
| 2.3.2 Die <i>decapping</i> -Faktoren DCP1a und EDC4 | 23 |
| 2.4 Zielsetzung dieser Arbeit | 24 |
| 3 MATERIAL | 25 |
| 3.1 Antikörper | 25 |
| 3.1.1 Primärantikörper | 25 |
| 3.1.2 Sekundärantikörper | 28 |
| 3.2 Bakterienstämme | 28 |
| 3.3 Chemikalien | 28 |
| 3.4 Enzyme | 29 |
| 3.5 Expressionsvektoren | 29 |
| 3.6 Gebrauchsfertige Kits und Reagenzien | 30 |
| 3.7 Geräte | 31 |
| 3.7.1 Divers | 31 |
| 3.7.2 Mikroskope | 32 |
| 3.7.3 PCR Thermocycler | 32 |
| 3.7.4 <i>Westernblot</i> -Apparaturen | 32 |
| 3.7.5 Zellkultur | 32 |
| 3.7.6 Zentrifugen | 33 |
| 3.8 Humane Zelllinien | 33 |
| 3.9 Inhibitoren | 34 |

| | |
|---|----|
| 3.10 Oligonukleotide..... | 34 |
| 3.11 Proteinmarker..... | 35 |
| 3.12 Puffer & Lösungen..... | 35 |
| 3.12.1 Kalziumphosphat Transfektion..... | 35 |
| 3.12.2 Medien..... | 36 |
| 3.12.3 Proteinlyse & Immunpräzipitation..... | 37 |
| 3.12.4 TaqMan® PreAmp Cells-to-CT™ Kit..... | 39 |
| 3.12.5 Westernblot..... | 39 |
| 3.13 Rekombinante Proteine | 40 |
| 3.14 TaqMan Sonden | 40 |
| 3.15 Verbrauchsmaterial | 41 |
| 4 METHODEN | 42 |
| 4.1 Arbeiten mit DNA und RNA | 42 |
| 4.1.1 Plasmidpräparation (Maßstab Mini) | 42 |
| 4.1.2 Plasmidpräparation (Maßstab Mini) | 42 |
| 4.1.3 RNA Präparation | 42 |
| 4.1.4 RNA Präparation aus Lasermikrodissektierten Zellen..... | 43 |
| 4.1.5 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmungen | 43 |
| 4.2 Arbeiten mit humanen adhärenen Zelllinien..... | 43 |
| 4.2.1 Einfrieren und Auftauen | 43 |
| 4.2.2 Kultivieren und Passagieren | 44 |
| 4.2.3 Stimulation und Ernte der Zellen | 44 |
| 4.2.4 Transfektion..... | 44 |
| 4.3 Arbeiten mit Proteinen | 46 |
| 4.3.1 Lyse eukaryotischer Zellen..... | 46 |
| 4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford | 48 |
| 4.3.3 Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP) | 49 |
| 4.3.4 Präzipitation von HIS markierten Proteinen über Ni ²⁺ -NTA-Agarose (Guanidiniumhydrochlorid) | 50 |
| 4.3.5 <i>in vitro</i> Dephosphorylierung in NET1 Puffer (ohne EDTA) | 50 |
| 4.3.6 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli mit <i>westernblot</i> | 51 |
| 4.3.7 Markierungsfreie Massenspektrometrie..... | 52 |
| 4.4 Arbeiten mit Viren | 54 |
| 4.4.1 <i>TCID₅₀ assay</i> | 54 |
| 4.4.2 Viruspropagation | 56 |
| 4.5 Bioinformatische Arbeiten | 56 |
| 4.5.1 Auswertung des A549 Kinetik <i>microarrays</i> (GEn-1311) | 56 |
| 4.5.2 Auswertung der A549 LMD <i>microarrays</i> (GEn-1314) | 56 |
| 4.5.3 Auswertung der HuH7 <i>microarrays</i> (GEn-1312, GEn-1313 und GEn-1548) | 57 |
| 4.5.4 Auswertung der markierungsfreien massenspektrometrischen Daten | 57 |
| 4.5.5 <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (KEGG) und <i>Gene Ontology</i> (GO) Analysen | 58 |

| | |
|---|------------|
| 4.6 Mikrobiologische Arbeiten | 59 |
| 4.6.1 Chemische Transformation | 59 |
| 4.6.2 Herstellung von Bakteriellen Dauerkulturen | 59 |
| 4.6.3 Herstellung von transformationskompetenten Bakterien (chemisch) | 59 |
| 4.7 PCR basierte Methoden..... | 60 |
| 4.7.1 <i>Microarrays</i> | 60 |
| 4.7.2 Mutagenese PCR | 60 |
| 4.7.3 Reverse Transkription (RT) | 62 |
| 4.7.4 <i>Real time</i> PCR (<i>TaqMan</i> basiert) | 62 |
| 4.7.5 <i>Real time</i> PCR (<i>SYBR green</i> basiert) | 64 |
| 4.7.6 <i>Real time</i> PCR (<i>PreAmp Cells to C_T</i> Kit)..... | 65 |
| 4.8 Zellbiologische Arbeiten | 66 |
| 4.8.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung | 66 |
| 4.8.2 Verkürzte indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Lasermikrodissektion | 67 |
| 5 ERGEBNISSE | 69 |
| 5.1 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort auf der Ebene des Transkriptoms | 69 |
| 5.1.1 Initiale Analyse der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort in humanen epithelialen alveolären adenokarzinomzellen (A549)..... | 69 |
| 5.1.2 Lasermikrodissektions (LMD) basierte Analyse der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort in humanen epithelialen alveolären Adenokarzinomzellen (A549)..... | 75 |
| 5.1.3 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort in epithelialen von Hepatozyten abgeleiteten Karzinomzellen (HuH7). | 84 |
| 5.1.4 Charakterisierung der Relevanz proinflammatorischer Prozesse für die virale Replikation und die Wirtszellantwort. | 95 |
| 5.2 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort auf den Ebenen des Proteoms und der posttranslationalen Modifikationen. | 104 |
| 5.2.1 Analyse der PERK abhängigen Phosphorylierung des viralen N Proteins | 107 |
| 5.2.2 Die Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Proteinveränderungen über markierungsfreie Massenspektrometrie offenbart eine Vielzahl an bisher unbekannten HCoV-229E spezifisch deregulierten Prozessen. | 112 |
| 5.2.3 Charakterisierung der Relevanz von <i>P-body</i> Proteinen für die virale Replikation. | 123 |
| 5.3 Charakterisierung von TRAF6 abhängigen posttranslationalen Modifikationen am <i>decapping</i> -Regulator DCP1a im Rahmen des IL-1a abhängigen proinflammatorischen Signalweges | 134 |
| 5.3.1 DCP1a spielt eine essentielle Rolle für die Expression IL-1a abhängiger Gene und wird TRAF6 abhängig posttranslational modifiziert..... | 135 |
| 5.3.2 Die C-Terminale Trimerisierung von DCP1a ist essentiell für die Phosphorylierung und die Ubiquitinierung von DCP1a | 139 |
| 6 DISKUSSION | 147 |
| 6.1 Identifizierung HCoV-229E spezifisch deregulierter Gene auf Ebene des Transkriptoms | 147 |
| 6.1.1 <i>Microarray</i> basierte bioinformatische Charakterisierung von infizierten A549 Zellen..... | 148 |
| 6.1.2 Weiterführende <i>microarray</i> basierte bioinformatische Charakterisierung von infizierten HuH7 Zellen..... | 150 |
| 6.1.3 Charakterisierung des proinflammatorischen NF-κB Signalweges und dessen Relevanz für die HCoV-229E Replikation | 152 |

| | |
|--|---------|
| 6.2 Identifizierung HCoV-229E spezifisch deregulierter Proteine auf Ebene des Proteoms und der posttranslationalen Modifikationen..... | 155 |
| 6.2.1 Analyse posttranslationaler Modifikationen an viralen Proteinen | 156 |
| 6.2.2 Analyse posttranslationaler Modifikationen an Wirtsproteinen..... | 158 |
| 6.3 Die Charakterisierung der IL-1a abhängigen TRAF6 vermittelten Ubiquitinierung von DCP1a | 166 |
| 7 ANHANG: | 170 |
| 7.1 Literaturverzeichnis..... | 170 |
| 7.2 Abbildungsverzeichnis | 180 |
| 7.3 Abkürzungsverzeichnis | 182 |
| 7.4 Portfolio | 183 |
| 7.4.1 Publikationen | 183 |
| 7.4.2 Vorträge/Seminare | 184 |
| 7.4.3 Betreute Masterstudenten | 184 |
| 7.5 Danksagung..... | 185 |

1 Zusammenfassung / *summary*

1.1 Zusammenfassung

Coronaviren (CoV) gehören zu den positiv einzelsträngigen RNA Viren und zeichnen sich durch ihr 30000 Basen umfassendes Genom aus. Sie vollziehen ihren Replikationszyklus im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle, einhergehend mit einer verstärkten inflammatorischen Genexpression. Bei pathogenen Formen wie *severe acute respiratory syndrome* (SARS)-CoV und *middle east respiratory syndrome* (MERS)-CoV kann diese inflammatorische Genexpression mit ernstzunehmenden pathologischen Veränderungen der unteren Atemwege einhergehen, was zum Tod der Patienten führen kann. Die Mechanismen über die Coronaviren diese inflammatorische Wirtsantwort aktivieren, sind bisher nur in Teilen verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Mechanismen am Beispiel des humanen Coronavirus 229E (HCoV-229E) systematisch auf den Ebenen der Transkription, der Translation und der posttranslationalen Modifikationen an Proteinen zu charakterisieren. Initial wurden mehrere vergleichende *microarray* Experimente in A549 Lungenkarzinomzellen und HuH7 Leberkarzinomzellen durchgeführt, um zeitabhängige, replikationsabhängige und Zelllinien unabhängige Veränderungen in infizierten Zellen zu determinieren. Diese Analysen umfassten Experimente, in denen infizierte Zellen von nicht infizierten Zellen über Lasermikrodissektion separiert wurden. *Overrepresentation analysis* (ORA) und *genes set enrichment analysis* (GSEA) zeigten, dass innerhalb der Gruppe der deregulierten Gene verschiedene Signalwege angereichert sind. Die am stärksten angereicherten Signalwege umfassen den Stress Signalweg des endoplasmatischen Retikulums (ER), den *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) Signalweg, sowie Gene der mitochondrialen Atmungskette. Bei einem Vergleich von HCoV-229E und Interleukin-1 (IL-1) induzierte Genexpressionsänderungen, konnten inflammatorische Mediatoren als charakteristische Zielgene für beide Bedingungen identifiziert werden. Der deutlich größere Teil der HCoV-229E regulierten Gene zeigte keine Überlappung mit einer IL-1 Stimulation, was impliziert, dass die virale Infektion eine breitere Wirtszellantwort induziert als das prototypische proinflammatorische IL-1. *Loss of function* Experimente zeigten, dass die NF- κ B Untereinheit p65 und TNFAIP3 (beides Komponenten des NF- κ B Signalweges) essentielle Wirtsfaktoren für die viral vermittelte Expressionsinduktion von NF- κ B Zielgenen (wie *IL8* und *CXCL2*) sind. Interessanterweise unterstützen beide Faktoren auch die optimale virale Replikation, da deren *knockdowns* die virale Transkription hemmen. Der TNFAIP3 *knockdown* hemmt außerdem die Translation des viralen *nucleocapsid* (N) Proteins.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die viral induzierte Wirtsantwort auf den Ebenen des Proteoms und der posttranslationalen Modifikationen mittels markierungsfreier Massenspektrometrie charakterisiert.

Die Analyse offenbarte, dass mehrere virale Proteine Ziel von zum Teil kombinierten Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen sind. Mit neu generierten phosphorylierungsspezifischen Antikörpern und zellpermeablen Proteinkinaseinhibitoren wurde gezeigt, dass zwei Phosphorylierungen am viralen N Protein von einer Kinase des ER Stress Signalweges (PERK) und von einer MAP Kinase (JNK) reguliert werden. Die Inhibition beider Kinasen führte außerdem zu verringerten viralen Titern. Auf Seiten des Wirtsproteoms wurden mehrere tausend Peptide identifiziert, die Acetylierung, Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen tragen. Von diesen wurde ein signifikanter Teil HCoV-229E abhängig differentiell reguliert. Die bioinformatische Analyse dieser Daten offenbarte eine Vielzahl von zellulären Strukturen und Prozessen, die von der Infektion auf Proteinebene beeinflusst werden. Dazu zählen unter anderen die Kernpore sowie Proteine, die an der Acetylierung von Histonen oder an der Übertragung von Ubiquitinketten beteiligt sind. Außerdem konnten mehrere regulierte posttranslationale Modifikationen an Proteinen nachgewiesen werden, die in *processing (P)-bodies* lokalisiert sind. Funktionelle Experimente zeigten, dass sich *P-bodies* im Verlauf der Infektion auflösen. Um dieses Phänomen zu charakterisieren, wurde eine reprimierte Phosphorylierung an EDC4 experimentell bestätigt und über phosphorylierungsspezifische Antikörper und EDC4 Mutanten untersucht. Die ektopische Expression einer phosphomimetischen EDC4 Mutante beeinflusste die virale Replikation nicht. Im Gegensatz dazu führte der EDC4 *knockdown* zu einer schwachen Hemmung der viralen N Protein Synthese. Darüber hinaus konnte die N Protein Synthese durch den *knockdown* der *P-body* Komponente DCP1a zelltypspezifisch verstärkt oder gehemmt werden. Diese Daten belegen eine bisher unbekannte Beteiligung von *P-body* Proteinen an der HCoV-229E Replikation. Weitere mechanistische Untersuchungen des DCP1a Proteins zeigten, dass dieses konstitutiv über den TRAF6 Signalweg ubiquitiniert wird.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit einer der systematischsten und umfassendsten bisher zur Verfügung stehenden Datensätze zur zellulären Reaktionen auf eine Coronavirus Infektion generiert. Diese Hochdurchsatz-Datensätze stellen eine Grundlage für weiterführende Analysen der tiefgreifenden Effekte einer HCoV-229E Infektion auf das Wirtszelltranskriptom und -proteom dar. Mechanistische Experimente zur Untersuchung des ER Stress Signalweges, des NF- κ B Signalweges und des *decapping/P-body* Signalweges unterstreichen die Relevanz dieser essentiellen Wirtszellsignalwege sowohl für die virale Replikation, als auch für die inflammatorische und metabolische Wirtsantwort.

1.2 summary

Coronaviruses (CoV) are plus stranded RNA viruses and are characterised by a large 30000 base genome. Their replication cycle takes place in the cytoplasm of the infected host cell, which is accompanied by increased expression of inflammatory genes. During the infection with pathogenic forms such as severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV or middle east respiratory syndrome (MERS)-CoV, this inflammatory gene expression contributes to severe lung disease, including acute respiratory distress syndrome (ARDS) and ultimately death. The mechanisms by which coronaviruses induce the expression of inflammatory or other host cell genes are only partially understood.

The aim of this thesis was to characterise the host cell gene response to the human coronavirus 229E (HCoV-229E) systematically at the level of transcription, translation and posttranslational modifications of proteins. Initially, multiple comparative microarray experiments were performed in A549 lung carcinoma and HuH7 liver carcinoma cells to reveal time-dependent, replication-dependent and cell type-independent changes of the transcriptomes of infected cells. This included a detailed analysis of virus-infected cells that were separated from non-infected cells by laser microdissection. Overrepresentation analyses (ORA) and gene set enrichment analyses (GSEA) revealed that deregulated gene sets were enriched for genes of multiple pathways. The most prominently deregulated pathways comprised the endoplasmic reticulum (ER) stress response, the nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway as well as genes of the mitochondrial respiratory chain. A comparison of gene expression changes induced by HCoV-229E infection with those of the proinflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1) revealed a small overlapping set of genes mainly encoding inflammatory mediators. However, far more genes were solitarily regulated by HCoV-229E indicating that virus infection induces a much broader host cell gene response than IL-1. Loss of function experiments showed that the NF- κ B subunit p65 as well as TNFAIP3 (both components of the NF- κ B pathway) are essential host factors not only required for virus-mediated induction of NF- κ B target genes (such as IL8 or CXCL2) but unexpectedly also support optimal replication as their knockdowns led to repressed viral transcription. The TNFAIP3 knockdown also caused a decrease in viral N protein translation.

In the second part of this thesis the viral host response was also assessed at the level of the proteome and of posttranslational modifications using label free mass spectrometry. This analysis uncovered that several viral proteins are targets of combined acetylation, phosphorylation and ubiquitination. By means of newly generated phosphorylation-site specific antibodies and cell permeable protein kinase inhibitors it was shown that two phosphorylation sites at the viral nucleocapsid (N) protein are phosphorylated by the ER stress kinase PERK and the MAP kinase JNK. Inhibition of both kinases also resulted in reduced viral titers. Within the host cell proteome, several thousand peptides carrying acetylations, phosphorylations or ubiquitinations were identified. A significant part of these peptides

were differentially modified in response to the HCoV-229E infection. Bioinformatic analyses revealed a large number of cellular compartments and processes that were affected by the infection at the protein level. Examples include the nuclear pore complex, proteins involved in the acetylation of histones or in the attachment of ubiquitin chains. Moreover, several proteins localising in processing (P)-bodies were found to carry virus-regulated posttranslational modifications. Functional experiments showed that P-bodies disintegrate during the course of HCoV-229E infection. To characterise this phenomenon, a repressed phosphorylation site at the structural P-body component EDC4 was experimentally confirmed and investigated in more detail using phospho-specific antibodies and specific EDC4 mutants. However, ectopic expression of phospho-mimicking variants of EDC4 did not affect viral replication. In contrast, EDC4 knockdown led to a weak reduction in viral N protein synthesis. Moreover, knockdown of another P-body component, DCP1a, also suppressed or enhanced viral N protein translation in a cell-type dependant manner. These data revealed a new contribution of P-body proteins to HCoV-229E replication. Further mechanistic studies of the DCP1a protein showed that it is constitutively ubiquitinated by TRAF6-dependent pathway.

In summary, the data obtained during this thesis represent one of the most systematic and comprehensive studies of the cellular response to CoV infections available to date. These –omics data provide a rich resource for continuing studies of the profound and broad effect of a HCoV-229E infection on the host cell transcriptome and proteome. Further mechanistic experiments targeting the ER stress response, the NF- κ B pathway and the decapping/P-body pathway highlight the relevance of these major host cell pathways for viral replication as well as inflammatory and metabolic host cell gene responses.

2 Einleitung

2.1 Coronaviren

Coronaviren gehören zur Gruppe der positiv einzelsträngigen RNA Viren und stellen eine Unterfamilie der *Coronaviridae* dar, die zur Ordnung der *Nidovirales* gehören (Gorbalenya, Enjuanes et al. 2006). Bis zum Ausbruch der *severe acute respiratory syndrome* (SARS) Epidemie in China 2002 waren insgesamt nur 10 Coronavirusspezies bekannt, wobei diese zwei humane Coronaviren (*human coronavirus 229E* (HCoV-229E) und *human coronavirus OC43* (HCoV-OC43)), sieben weitere Säugetiercoronaviren (*mouse hepatitis virus* (MHV), *bovine coronavirus* (BCoV), *porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus* (PHEV), *transmissible gastroenteritis virus* (TGEV), *porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV), *porcine respiratory coronavirus* (PRCV) und *feline coronavirus* (FCoV)) und einen Vogelcoronavirus (*avian infectious bronchitis virus* (IBV)) umfassten (Woo, Lau et al. 2009; Zumla, Chan et al. 2016). Vor allem durch das erhöhte Forschungsaufkommen an Coronaviren durch die SARS Epidemie erhöhte sich die Anzahl auf mittlerweile 30 verschiedene Spezies, wobei auch neue Wirte wie Fledermäuse, Dromedare, Belugawale, Delphine und verschiedene Vogelarten identifiziert wurden (aktuelle Daten des *international committee of taxonomy of viruses* (ICTV))(Chan, To et al. 2013). Darunter finden sich vier humane Coronaviren (*human coronavirus NL63* (HCoV-NL63), *human coronavirus HKU1* (HCoV-HKU1), *severe acute respiratory syndrome related coronavirus* (SARS-CoV) und das *middle east respiratory syndrome related coronavirus* (MERS-CoV)), wobei es sich bei SARS-CoV und MERS-CoV um Viren handelt, die ernste pathologische Veränderungen der unteren Atemwege hervorrufen, was unter anderem zu Atemwegsversagen und zum Tod der Patienten führen kann (Mortalität SARS-CoV = 10% - 50% / MERS-CoV = 50%) (Graham, Donaldson et al. 2013). Bei beiden Viren handelt es sich um zoonotische Formen, die die Artenbarriere erst vor kurzem übersprungen haben. Die vier übrigen humanen Coronaviren, persistieren schon seit 65 bis 560 Jahren in der humanen Population und verursachen im Rahmen einer Infektion der oberen Atemwege in der Regel leichte Erkältungssymptome (Graham, Donaldson et al. 2013). Die Infektion kann bei Kleinkindern und älteren, - sowie immunschwachen/supprimierten Menschen allerdings auch einen ernsteren bis lebensbedrohlichen Verlauf nehmen (Reed 1984; Peiris, Lai et al. 2003; Simon, Volz et al. 2007). Daher stellen Coronaviren eine ernstzunehmende Gefahr dar, was es unerlässlich macht, die molekularen Prozesse zu verstehen, die der Infektion zu Grunde liegen, um neue Therapieansätze zu etablieren. Aktuell werden viele Ansätze verfolgt, um Medikamente gegen Coronaviren zu entwickeln, aber nur wenige davon greifen in zelluläre Signalwege ein. Die meisten Substanzen hemmen Prozesse, wie die virale Transkription, durch Inhibition der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase mit Ribivarin (Zumla, Chan et al. 2016). Da Viren sich generell durch hohe Mutationsraten auszeichnen,

können sie sich schnell an neue Bedingungen anpassen (Jenkins, Rambaut et al. 2002). Daher ist es langfristig effizienter, zelluläre für die Replikation relevante Prozesse zu blockieren, um eine virale Anpassung zu erschweren.

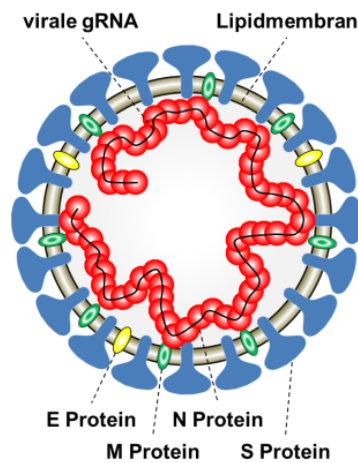
2.1.1 Coronavirus Phylogenie, Struktur und Genom

Coronaviren werden momentan in vier Gruppen unterteilt (Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren), wobei Alpha- und Betacoronaviren säugetierspezifische -, Gammacoronaviren vogelspezifische- und Deltacoronaviren säugetier- und vogelspezifische Viren enthalten. Darüber hinaus werden die Alpha- und Betacoronaviren in jeweils 3 Untergruppen eingeteilt.

Obwohl sich die Genomsequenz der einzelnen Coronavirusgruppen zum Teil stark voneinander unterscheiden, da sie sich evolutionär vor ca. 5000 Jahren voneinander trennten, blieb der grundlegende Aufbau der Viren gleich (Woo, Lau et al. 2009). Die Virionen aller Coronaviren haben eine Größe von 80 - 120 nm und enthalten das 26,2-31,7 kb große RNA Genom (Lai and Cavanagh 1997; Masters 2006). Dieses ist dabei an helikal multimerisierte *nucleocapsid* (N) Proteine assoziiert (Yu, Gustafson et al. 2005; Lo, Lin et al. 2013). Außerdem enthält die Lipidhülle der Virionen drei weitere Strukturproteine (*envelope* (E) Protein, *membrane* (M) Protein, *spike* (S) Protein), wobei das S Protein während der Infektion mit dem Rezeptor der Wirtszelle interagiert, um die Membranfusion einzuleiten. Das M Protein steuert die Herstellung der Virionen, kann daher mit den übrigen Strukturproteinen interagieren und ist das abundanteste Protein in den Virionen (Masters 2006; Ujike and Taguchi 2015). Die Funktionen des E Proteins werden kontrovers diskutiert, das es hauptsächlich beim „*budding*“ der Virionen aus dem *endoplasmic reticulum to golgi intermediate compartment* (ERGIC) eine Rolle zu spielen scheint, während es in den Virionen selbst nur in geringer Anzahl vorkommt (Venkatagopalan, Daskalova et al. 2015)(siehe auch Abbildung 1A).

Die proximalen zwei Drittel des RNA Genoms von Coronaviren codieren alle für die Reproduktion der viralen Genome relevanten Proteine in Form von zwei *open reading frames* (ORF). Durch die Translation des ersten ORFa entsteht ein Polyprotein (pp1a), welches autoproteolytisch in 11 *non structural proteins* (NSP) gespalten wird. Darüber hinaus kann es während der Translation zu einer -1 Verschiebung des Ribosoms im Leseraster kommen, was zur Translation des zweiten ORFab führt (Brierley, Bourns et al. 1987). Auch das dabei entstehende Polyprotein (pp1ab) wird autoproteolytisch gespalten, wodurch 15 NSP entstehen. Diese insgesamt 16 Proteine wiederum steuern die Genomreplikation, sowie die Synthese der subgenomischen RNA (subgRNA). Das letzte Drittel des Genoms codiert die vier konservierten Strukturproteine, sowie zusätzliche ORF, wobei deren Anzahl und Position innerhalb der Unterfamilie Coronaviren stark variieren kann (Sola, Almazan et al. 2015)(siehe auch Abbildung 1B).

A



B

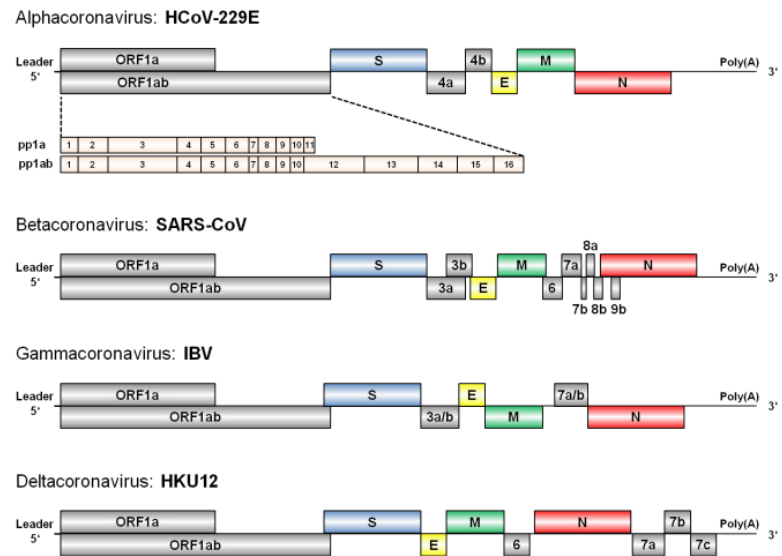


Abbildung 1: Struktur des Virions und des Genoms verschiedener Coronaviren. (A) Schematische Darstellung eines für Coronaviren repräsentativen Virions (B) Schematische Darstellung von repräsentativen RNA Genomen der vier Coronavirus Gruppen. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu. Die ersten zwei Drittel des Genoms kodieren zwei *open reading frames* (ORF), die nach der Translation autoproteolytisch gespalten werden, wodurch 16 *non structural proteins* entstehen, die für die Replikation verantwortlich sind. Im letzten Drittel werden die Strukturproteine sowie verschiedene weitere ORF's kodiert. gRNA = genomische RNA, E = *envelope*, M = *membrane*, N = *nucleocapsid*, S = *spike*, HCoV-229E = *human coronavirus 229E*, SARS-CoV = *severe acute respiratory syndrome related coronavirus*, IBV = *infectious bronchitis virus*, HKU12 = *human Coronavirus HKU12*, pp1a = *polyprotein 1a*, pp1ab = *polyprotein 1ab*, Poly(A) = Poly-Adenin-Überhang, modifiziert nach (Perlman and Netland 2009)

2.1.2 Coronavirus Replikationszyklus

Der virale Replikationszyklus beginnt, wie bereits erwähnt, mit der Rezeptorinteraktion des viralen S Proteins auf der Oberfläche der Virionen. Die direkte Interaktion wird dabei von der S1 Untereinheit vermittelt, die damit den Tropismus der Viren determiniert, während die S2 Untereinheit anschließend die Membranfusion einleitet (Kuo, Godeke et al. 2000). Die von den verschiedenen humanen Coronaviren verwendeten Rezeptoren umfassen dabei die *aminopeptidase-N* (APN) im Fall des HCoV-229E, das *angiotensin converting enzyme II* (ACE2) bei HCoV-NL63 und SARS-CoV, die *dipeptidyl peptidase 4* (DPP4) bei MERS-CoV, sowie die *9-O-Acetylated sialic acid* (9-O-Ac-Sia) bei der Infektion mit HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 (Yeager, Ashmun et al. 1992; Kuhn, Li et al. 2004; Hofmann, Pyrc et al. 2005; Desforges, Desjardins et al. 2013; Raj, Mou et al. 2013; Huang, Dong et al. 2015). Nach der Membranfusion werden die Viren in das Endosom transportiert, wo es zu einer weiteren Membranfusion kommt, bei der die virale genomische RNA (gRNA) zytoplasmatisch freigesetzt wird. Danach agiert die gRNA als mRNA und wird ribosomal translatiert. Die dadurch

2 Einleitung

entstehenden viralen NSPs nutzen den gRNA-Strang als Matrize für die Synthese invers komplementärer Stränge. Diese wiederum dienen als Matrize für die Synthese von neuen gRNAs. Darüber hinaus werden außerdem durch diskontinuierliche Transkription subgRNAs gebildet, die zur Translation der Strukturproteine und der subgenomischen ORF dienen (Lai and Cavanagh 1997). Diese hochkomplexen Prozesse laufen dabei nicht frei im Zytoplasma ab, stattdessen bilden sich *replicase transcription complexes* (RTC), die an intrazelluläre Membranen gekoppelt werden (Oostra, te Lintelo et al. 2007). Dafür verändern Coronaviren das intrazelluläre Membrannetzwerk, was zur Ausbildung von *double membrane vesicles* (DMV) führt und durch NSP3, NSP4 und NSP6 vermittelt wird (Gosert, Kanjanahaluethai et al. 2002; Oostra, te Lintelo et al. 2007; Angelini, Akhlaghpour et al. 2013). RTCs sind direkt an DMVs assoziiert, sodass sich Coronaviren für die Replikation des Genoms ein eigenes subzelluläres Kompartiment schaffen (Snijder, van der Meer et al. 2006). Obwohl die Ausbildung von DMVs einen generell konservierten Mechanismus darstellt, unterscheidet sich die Struktur der ausgebildeten Membranorganellen zwischen den verschiedenen Spezies der Coronaviren (Neuman, Angelini et al. 2014). Die Translation der Strukturproteine erfolgt am endoplasmatischen Retikulum (ER), wobei die membranständigen E, M und S Proteine in der ER Membran verbleiben, wohingegen N Proteine zytoplasmatisch freigesetzt werden und mit viraler gRNA Nucleocapside bilden (Masters 2006). Alle Strukturproteine werden zum *endoplasmic reticulum to golgi intermediate compartment* (ERGIC) transportiert, wo neue Virionen über *budding* im ERGIC gebildet werden. Diese wiederum verlassen die Zelle über den sekretorischen Signalweg innerhalb von *smooth-wall* Vesikeln (Krijnse-Locker, Ericsson et al. 1994)(siehe auch Abbildung 2).

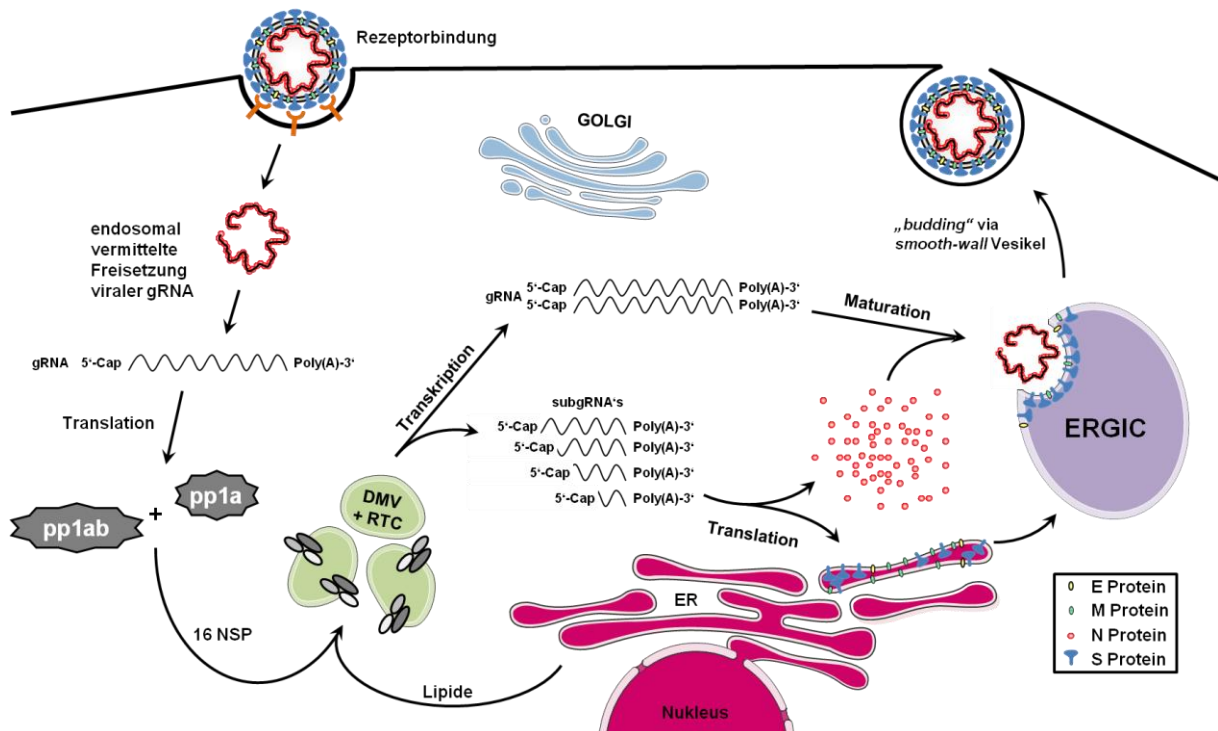


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Coronaviren. Die Infektion beginnt mit der Bindung des Virions an den zellulären Rezeptor. Dadurch wird das Virion aufgenommen und zum Endosom transportiert, in welchem die virale genomische RNA (gRNA) freigesetzt wird. Anschließend wird sie ribosomal translatiert. Die entstehenden *non structural proteins* (NSP) bilden *double membrane vesicles* (DMV) aus, an denen der *replicase transcription complex* (RTC) beginnt die gRNA und die subgenomische RNA (subgRNA) zu replizieren. Die subgRNA wird ebenfalls ribosomal translatiert, sodass die viralen Strukturproteine gebildet werden. Daraufhin werden am *endoplasmatic reticulum to Golgi intermediate compartment* (ERGIC) neue Virionen gebildet, die die Zelle via *budding* verlassen. E = *envelope*, ER = endoplasmatisches Retikulum, M = *membrane*, N = *nucleocapsid*, pp = *Polypotein* S = *spike*

2.2 Coronavirus induzierte zelluläre Signalwege

In den meisten Zellen kommt es in Folge einer Virusinfektion zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege, die zum Teil pro- und zum Teil antivirale Funktionen wahrnehmen. Für Coronaviren wie SARS-CoV, MHV und IBV ist bekannt, dass sie den ER Stress Signalwege aktivieren (Tang, Chan et al. 2005; Versteeg, van de Nes et al. 2007; Liao, Fung et al. 2013), wobei es widersprüchliche Ergebnisse dazu gibt, ob dies die virale Replikation fördert oder hemmt. Darüber hinaus kommt es in SARS-CoV infizierten Zellen und Geweben zu einer verstärkten Sekretion von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren wie *Interleukin-1* und *Interleukin-6* (IL-1 und IL-6) (Jiang, Xu et al. 2005; Smits, de Lang et al. 2010). Aus diesem Grund werden im Folgenden die zugehörigen Signalwege des ER Stresses und der proinflammatorischen Entzündung und deren Verbindungen zu Coronaviren im Detail vorgestellt.

2.2.1 ER Stress Signalweg

Das ER besitzt eine Vielzahl von Funktionen, wie die Regulation des Lipidhaushalts und der intrazelluläre Calcium Homöostase (Fagone and Jackowski 2009; Lam and Galione 2013). Darüber hinaus stellt es ein essentielles Kompartiment der Proteintranslation dar, wobei Proteine in das Innere des ERs (Lumen) synthetisiert werden können, um dann über vesikulären Transport zum Zielort zu gelangen. Außerdem werden membranständige Proteine am ER translatiert (Reid and Nicchitta 2015). Es wird geschätzt, dass ein Drittel der zellulären Translation am ER umgesetzt wird (Mori 2000; Dejeans, Manie et al. 2014). Dabei unterliegen die Proteine einer konstanten Qualitätskontrolle, um eine Anhäufung fehlgefalteter Proteine zu begrenzen. Das ER enthält dafür ein komplexes Netzwerk aus Chaperonen und anderen Kontrollproteinen. Gelangen trotzdem fehlgefaltete Proteine in das ER-Lumen, werden diese der *ER-associated degradation* (ERAD) zugeführt (Hetz, Chevet et al. 2015). Dadurch werden die fehlgefalteten Proteine ins Zytosom überführt und ubiquitiniert, was sie für den proteasomalen Abbau markiert (Ron and Walter 2007). Kommt es zu einer außergewöhnlich hohen Konzentration an fehlgefalteten Proteinen im ER, können die Grenzen des ERAD Mechanismus erreicht werden, was zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges führt. Dieser gliedert sich in drei einzelne Arme, die jeweils einen eigenen initial aktivierten Sensor besitzen (*activating transcriptionfactor 6* (ATF6), *inositol requiring enzyme 1* (IRE1), *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK))(Tirasophon, Welihinda et al. 1998; Harding, Zhang et al. 1999; Haze, Yoshida et al. 1999). Die Aktivierung dieser Sensoren erfolgt allerdings in allen drei Fällen auf die gleiche Weise. Das Chaperon *heat shock protein family A (Hsp70) member 5* (HSPA5) auch bekannt als BiP oder GRP78 bindet unter normalen Bedingungen an den luminären Teil der drei Sensoren und blockiert dadurch eine Aktivierung. Kommt es zu einer Anhäufung fehlgefalteter Protein, disloziert HSPA5 von den Sensoren und bindet spezifisch die hydrophoben Domänen der fehlgefalteten Proteine. Dadurch werden alle drei ER Stress Sensoren aktiviert (Ron and Walter 2007; Hetz, Chevet et al. 2015). Am Beispiel des MHV und des SARS-CoV konnte gezeigt werden, dass die Expression des viralen S Proteins ausreicht, um den ER Stress Signalweg zu aktivieren, wohingegen die Expression der übrigen Strukturproteine nicht zu dieser Reaktion führten (Chan, Siu et al. 2006; Versteeg, van de Nes et al. 2007). Dementsprechend scheint vor allem die Expression des mehrfach glykosylierten S Proteins für infizierte Zellen ein Stressfaktor zu sein. Dies wird dadurch unterstützt, dass gezeigt werden konnte, dass das S Protein mit Chaperonen interagiert (Fukushi, Yoshinaka et al. 2012).

Bei dem ersten der drei ER Stress Sensoren (PERK) handelt es sich um eine Serin-Threonin-Proteinkinase. Nach der Dimerisierung des PERK Sensors durch die Dislokation von HSPA5 auf der luminalen Seite kommt es zu einer Autophosphorylierung *in trans* auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors (Bertolotti, Zhang et al. 2000). Dies rekrutiert die α -Untereinheit des *eukaryotic translation initiation factor-2* (eIF2a), die in Folge dessen an Serin 51 phosphoryliert wird (Scheuner, Song et al. 2001). Dadurch wird der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor eIF2b inhibiert, wodurch eine generelle

2 Einleitung

Inhibition des eIF2 Komplexes vermittelt wird, was mit einer verringerten Translationsinitiationsrate einhergeht (Harding, Zhang et al. 1999). Eine verringerte Synthese neuer Proteine soll verhindern, dass die Anzahl fehlgefalteter Proteine im ER weiter ansteigt, was der Zelle Zeit verschafft, um fehlgefaltete Proteine zu degradieren, oder in die richtige Struktur zu bringen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von eIF2a auch weitere Prozesse des ER Stress Signalweges beeinflusst, da ein PERK knockout oder die Überexpression einer phosphorylierungsinkompetenten S51A Mutante von eIF2a die Expressionsinduktion verschiedener typischer Zielgene wie *homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1* (HERPUD1) vermindert (Scheuner, Song et al. 2001; Harding, Zhang et al. 2003). Dies wird über die transkriptionelle Expressionsinduktion des Transkriptionsfaktors *activating transcription faktor 4* (ATF4) vermittelt (Vattem and Wek 2004).

Eine PERK vermittelte Phosphorylierung von eIF2a konnte unter anderem im Rahmen einer MHV Infektion beobachtet werden. Die gleichzeitige Expression einer inaktiven Phosphorylierungsmutante von eIF2A (S51A) verminderte allerdings nicht die Replikationsrate des Virus im Zellkultursystem, was darauf schließen lässt, dass die PERK Aktivierung für die initiale Replikation irrelevant ist (Raaben, Groot Koerkamp et al. 2007). Nichtsdestotrotz könnten die damit einhergehenden Expressionsänderungen in einem lebenden Organismus durchaus eine relevante antivirale Funktion durch die Stimulation des Immunsystems haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch die PERK Aktivierung zu einer erwarteten Induktion der ATF4 Expression kommt. Die ATF4 induzierten Zielgene *DNA damage inducible transcript 3* (DDIT3 auch CHOP oder CEBPZ) und *protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A* (PPP1R15A auch GADD34) werden hingegen nicht aktiviert, was darauf hinweist, dass das MHV die Aktivierung der PERK abhängigen Achse des ER Stress Signalweges an einem späteren Schritt blockiert (Bechill, Chen et al. 2008).

Im Gegensatz dazu stimuliert eine Infektion mit IBV sowohl die Phosphorylierung von eIF2a als auch die Expression von PPP1R15A. Da PPP1R15A die regulatorische Untereinheit der Phosphatase ist, die eIF2a wieder dephosphoryliert, nimmt die Phosphorylierung von eIF2a an Serin 51 im Verlauf der Infektion zunächst zu und im späteren Stadium der Infektion wieder ab (Liao, Fung et al. 2013). Die Dephosphorylierung scheint dabei für die Replikation des IBV essentiell zu sein, da durch eine inhibitorbasierte Hemmung der PPP1R15A vermittelten Phosphataseaktivität die Phosphorylierung von eIF2a nicht wieder abnimmt, was mit einer verringerten Replikation einhergeht (Wang, Liao et al. 2009)

Für das Coronavirus TGEV konnte gezeigt werden, dass eines der subgenomisch kodierten Proteine direkt mit PPP1R15A interagiert und dessen Funktion blockiert. Ohne dieses Protein kommt es zu einer verstärkten eIF2a Phosphorylierung, was im verwendeten Zellsystem zu einer schnelleren Einleitung der Apoptose führt. In infizierten Ferkeln konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Proteins klinische Symptome verstärkte, was zeigt dass der ER Stress Signalweg auch immunmodulatorisch relevant ist (Cruz, Sola et al. 2011).

2 Einleitung

Auch der zweite Rezeptor des ER Stress Signalweges (IRE1) dimerisiert nach der Dislokation des luminalen HSPA5, was eine *trans*-Autophosphorylierung auf der zytoplasmatischen Seite induziert (Bertolotti, Zhang et al. 2000). Dadurch wird die RNase Domäne des Rezeptors aktiviert, die wiederum die mRNA des Transkriptionsfaktors *X box binding protein 1* (XBP1) bindet und eine 26 Nukleotide umfassende intronische Sequenz entfernt (Yoshida, Matsui et al. 2001). Die so entstehende mRNA (XBP1s) codiert im Gegensatz zur unprozessierten mRNA (XBP1u) den aktiven Transkriptionsfaktor, der translatiert wird, in den Kern transloziert und dort die Genexpression verschiedener Chaperone aktiviert, welche die im ER angereicherten fehlgefalteten Proteine wieder in die physiologische Struktur bringen sollen. Darüber hinaus wird außerdem die Expression von ERAD assoziierten Genen induziert (Calfon, Zeng et al. 2002).

Neben der PERK Aktivierung, kommt es im Rahmen einer SARS-CoV Infektion auch zu einer schwachen IRE1 Aktivierung, wobei dies nur in einer von zwei Publikationen gezeigt werden konnte (Versteeg, van de Nes et al. 2007; DeDiego, Nieto-Torres et al. 2011). Darüber hinaus ist das E Protein dabei ein relevanter Faktor für die Hemmung der IRE1 Aktivierung. In Zellen, die mit einer Mutante infiziert wurden, der das E Protein fehlt, wurde eine deutlich verstärkte IRE1 Aktivierung nachgewiesen (DeDiego, Nieto-Torres et al. 2011).

Obwohl gezeigt werden konnte, dass es durch eine Infektion mit MHV zu einer Aktivierung des IRE1 Rezeptors kommt, ist dies für die proximal vom IRE1 Rezeptor induzierten Zielgene, ähnlich wie bei der PERK Aktivierung, nicht der Fall (Bechill, Chen et al. 2008).

Auch im Rahmen einer TGEV Infektion konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung des IRE1 Rezeptors kommt. Interessanterweise führt der *knockdown* von IRE1 nicht zu einer verringerten Replikation, aber zu einer schnelleren Einleitung der Apoptose. Eine IRE1 Überexpression zögert die Apoptose hinaus, sodass das Virus durch die IRE1 Aktivierung einen Vorteil generiert, da es mehr Zeit hat neue Virionen zu produzieren. Auch wenn dies im Zellkulturmodell keinen Einfluss auf die Replikation hatte, kann dies in einem Organismus zu einer deutliche veränderten Pathogenität führen (Fung, Liao et al. 2014).

Der dritte Rezeptor des ER Stress Signalweges (ATF6) wird nach der Dislokation von HSPA5 in das GOLGI Kompartiment transportiert, wo er wiederum von den *site-1* und *site-2 proteases* (S1P und S2P) gespalten wird. Die funktionelle zytoplasmatische Form von ATF6 (ATF6f) kann daraufhin in den Kern translozieren und aktiviert ähnlich wie ATF4 und XBP1 die Expression verschiedener ER Stress und ERAD Gene (Haze, Yoshida et al. 1999).

Für das SARS-CoV konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Spaltung und Aktivierung von ATF6 kommt (DeDiego, Nieto-Torres et al. 2011). Da bereits gezeigt wurde, dass auch die IRE1 Achse des ER Stress Signalweges gehemmt wird, wirft dies die Frage auf, warum das Virus exklusiv die PERK Achse des ER Stress Signalweges aktiviert, während es die beiden anderen Achsen aktiv hemmt. Sowohl der zugrundeliegende Mechanismus, als auch die Funktion sind bisher unbekannt.

2 Einleitung

Für das MHV konnte eine Spaltung von ATF6 nachgewiesen werden, aber die Abundanz des Rezeptors wird durch die PERK vermittelte Translationsinhibition so stark vermindert, dass die Aktivierung von ATF6 Zielgenen nicht nachgewiesen werden konnte (Bechill, Chen et al. 2008).

Zusammengefasst führt die Aktivierung dieser drei ER Stresssensoren zu massiven Änderungen der ER Homöostase. Es kommt erstens zu einer zellulären Translationsinhibition, um eine weitere Ansammlung fehlgefalteter Proteine zu verhindern. Dies wird direkt von PERK induziert, indem es in seiner aktiven Form eIF2a an Serin 51 phosphoryliert. Darüber hinaus kommt es zweitens zu einer verstärkten Translation von Chaperonen und anderen faltungsunterstützenden Proteinen, um die Faltungskapazität im ER zu erhöhen. Als drittes kommt es außerdem zu einer Erhöhung der Kapazität des ERAD Mechanismus, um mehr fehlgefaltete Proteine abbauen zu können. Kommt es in Folge dessen zu keiner Verringerung der Last an fehlgefalteten Proteinen, leiten die gleichen Mechanismen die Apoptose der Zelle unter anderem über *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) ein (Harding, Zeng et al. 2001). Für verschiedenen Coronaviren wurde dargelegt, dass es im Verlaufe der Infektion zu einer vollständigen oder partiellen Aktivierung des ER Stress Signalweges kommt. Obwohl es dabei durchaus Parallelen zwischen den Coronavirusspezies gibt, moduliert jedes den Signalweg auf eine andere Weise (zusammengefasst in Abbildung 3).

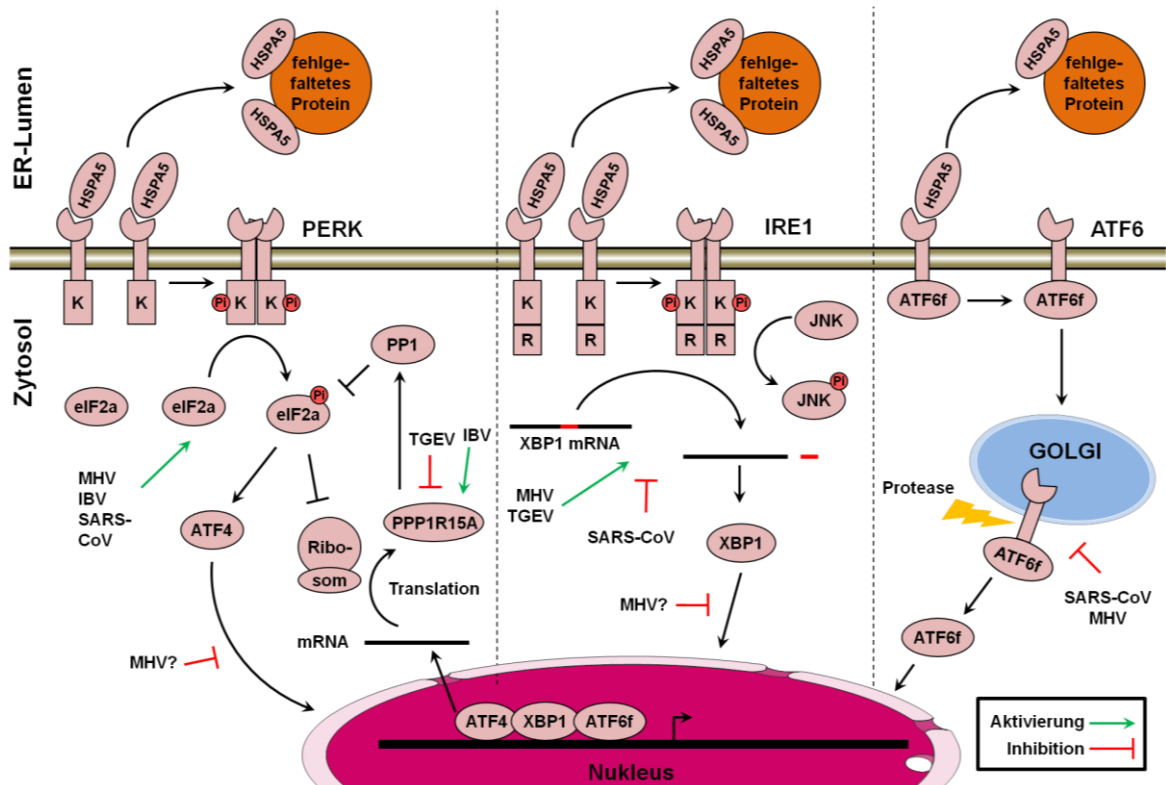


Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Achsen des ER Stress Signalweges. HSPA5 bindet an fehlgefaltete Proteine, die im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) akkumulieren. Dadurch werden die drei ER Stress Sensoren aktiviert, sodass PERK und IRE1 jeweils Homodimere bilden, die sich in *trans* autophosphorylieren. PERK phosphoryliert daraufhin eIF2a, was zur globalen Verminderung der Translation führt. Weiterhin wird der Transkriptionsfaktor ATF4 aktiviert, der wiederum die Expression weiterer Zielgene induziert. Dazu gehört unter anderem PPP1R15A, welches als regulatorische Untereinheit die Dephosphorylierung von eIF2a und damit eine negative Rückkopplung induziert. Durch die Aktivierung von IRE1 wird die nukleolytische Spaltung der XBP1 mRNA induziert, wodurch es einer Verschiebung im Leseraster der mRNA kommt. In Folge dessen wird der aktive Transkriptionsfaktor XBP1 synthetisiert, welcher im Zellkern die Expression weiterer Zielgene induziert. Ferner phosphoryliert das aktivierte IRE1 JNK. ATF6 wird nach der Dislokation von HSPA5 in das GOLGI Kompartiment transportiert, wo es zu einer proteolytischen Spaltung kommt, welche die funktionelle Untereinheit von ATF6 (ATF6f) zytoplasmatisch freisetzt. Diese transloziert in den Zellkern und vermittelt die Expression weiterer Zielgene. Die bekannten Einflüsse verschiedener Coronaviren sind mit grünen und roten Pfeilen dargestellt. Pi = Phosphorylierung, K = Kinasedomäne, R = RNase Domäne

2.2.2 IL-1 Signalweg

Die *Interleukin-1* (IL-1) Familie der Zytokine umfasst 11 Proteine, die eine essentielle Rolle bei lokalen und systemischen Entzündungen spielen. Sie werden durch das Immunsystem als Reaktion auf *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage/danger-associated molecular patterns* (DAMPs) ausgeschüttet (Gaestel, Kotlyarov et al. 2009; Garlanda, Dinarello et al. 2013). Die beiden wichtigsten Mitglieder der IL-1 Familie sind IL-1a und IL-1b, deren Aminosäuresequenzen nur zu 24% identisch sind, die aber trotzdem den gleichen Rezeptor binden und im Wesentlichen die gleichen biologischen Funktionen wahrnehmen (Dinarello 2009). Sie unterscheiden sich primär durch ihren

Wirkradius, da IL-1a auto- und juxtakrin wirkt, wohingegen IL-1b eine systemische Funktion wahrnimmt. Beide Zytokine agieren als Mediatoren, die hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten als Reaktion auf PAMPs und DAMPs ausgeschüttet werden. Eine Deregulierung des IL-1 Signalweges kann zu chronischen Entzündungskrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, Asthma oder einer Psoriasis führen (Gaestel, Kotlyarov et al. 2009).

In Zellen, die durch IL-1 stimuliert werden, kommt es binnen Minuten bis Stunden zu einer massiven Induktion und Repression hunderter Zielgene. Zu den induzierten Genen gehören unter anderen die IL-1 Gene, wodurch eine positiven Rückkopplung des Zytokinsignales bewirkt wird (Gaestel, Kotlyarov et al. 2009). Damit auch kleine Mengen IL-1 wahrgenommen werden können, kommt es nach einer Rezeptoraktivierung zur Amplifikation des Signals via einer *mitogene activated protein* (MAP) Kinase Kaskade. In derartigen Kaskaden sind drei Ebenen von Kinasen sequentiell aneinander gekoppelt, sodass es auf jeder Ebene zu einer exponentiellen Verstärkung des Signals kommt. Auf diese Weise reicht die Bindung eines einzigen IL-1 Liganden an seinen Rezeptor aus, um die Genexpression von Zielgenen, zu denen auch Transkriptionsfaktoren gehören, zu aktivieren (Gaestel, Kotlyarov et al. 2009).

Im ER Stress Signalweg fungieren die Rezeptoren (PERK und IRE1) selbst als Kinasen, indem zwei Monomere durch den fehlenden Inhibitor HSPA5 einen Dimer bilden, welches sich selbst autophosphoryliert (Rezeptor-Tyrosin-Kinase)(Tirasophon, Welihinda et al. 1998; Harding, Zhang et al. 1999). Im Gegensatz dazu wird der IL-1 Ligand zunächst von einem Monomer des IL-1 Rezeptors Typ 1 (IL-1R1) gebunden. In Folge der Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung in der ersten extrazellulären Domäne des Rezeptors. Dadurch kann das *IL-1 receptor accessory protein* (IL-1RAcP) rekrutiert werden, sodass ein aktiviertes Heterodimer entsteht (Wesche, Korherr et al. 1997). Dieses Dimer kann *myeloid differentiation primary response gene 88* (MYD88) binden, welches wiederum die Kinasen *IL-1R associated kinase* (IRAK) 1, 2 und 4 aktiviert (Wesche, Henzel et al. 1997). In Folge dessen kommt es zur Rekrutierung der E3-Ligase *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6), welches sich selbst mit Hilfe der E2-Ligase *ubiquitin conjugating enzyme E2 N* (UBE2N (auch UBC13)) K63 autoubiquitiniert, um dann K63 verknüpfte Ubiquitinketten an Zielproteine zu koppeln (Ye, Arron et al. 2002). Eines dieser Zielproteine ist *MAP3K transforming growth factor β activated kinase 1* (TAK1), wobei außerdem die Adaptorproteine *TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 2* und 3 (TAB2/3), sowie die regulatorische Untereinheit *TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 1* (TAB1) relevant sind (Wang, Deng et al. 2001; Cheung, Nebreda et al. 2004). Es kommt außerdem zur Aktivierung einer negativen Rückkopplung über *TNF alpha induced protein 3* (TNFAIP3 oder A20). TNFAIP3 deubiquiniert TRAF6, um die IL-1 abhängige Induktion des proinflammatorischen Signalweges wieder zu deaktivieren (Bannon, Zhang et al. 2015). Das aktivierte TAK1 fungiert als die erste Kinase in drei Kinasekaskaden (Gaestel, Kotlyarov et al. 2009).

Es phosphoryliert zum einen *mitogen-activated-protein kinase kinase 3* und 6 (MKK3/6), welche proximal *mitogen-activated-protein kinase kinase 14* (p38) phosphorylieren. p38 wiederum aktiviert eine Vielzahl an weiteren Proteinen, wie Kinasen, Transkriptionsfaktoren, zytosolische Proteine und sogar RNA bindende Proteine wie *heterogeneous nuclear ribonucleoparticle A0* (HNRNP A0). Es hat außerdem einen stabilisierenden Effekt auf mRNA, da es die Degradation von *tristetraprolin* (TTP) vermittelt, welches einen destabilisierenden Effekt auf mRNAs hat. Daher ist p38 einer der wichtigsten Regulatoren, der IL-1 induzierten Genexpressionsveränderungen (Anderson 2008; Gaestel, Kotlyarov et al. 2009). Obwohl bekannt ist, dass Coronaviren wie SARS-CoV, MHV und IBV die Aktivierung von p38 vermitteln, sind der zugrundeliegende Mechanismus und deren Funktion im Rahmen einer Coronavirusinfektion unbekannt. Nichtsdestotrotz konnte im Fall des IBV gezeigt werden, dass die p38 Aktivierung in Zusammenhang mit der Ausschüttung von Zytokinen steht (Banerjee, Narayanan et al. 2002; Mizutani, Fukushima et al. 2004; Liao, Wang et al. 2011).

Die *c-Jun N-terminal kinases* (JNK1/2/3) Familie hat ebenfalls eine Schlüsselrolle in Rahmen der IL-1 induzierten Genexpressionsänderungen, und wird TAK1 abhängig über *mitogen-activated-protein kinase kinase 4* und 7 (MKK4/7) phosphoryliert (Tournier, Dong et al. 2001). JNK ist in der Lage Transkriptionsfaktoren wie *tumor protein p53* (p53), *SMAD family member 4* (SMAD4) und *Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit* (JUN) zu phosphorylieren (Adler, Pincus et al. 1997; Morton, Davis et al. 2003; Liu, Zhang et al. 2012). Darüber hinaus interagiert es mit Strukturproteinen wie *JNK interacting protein 1* und 2 (JIP1/2) und ist in der Lage den *decapping* Regulator *decapping mRNA 1A* (DCP1a) an Serin 315 zu phosphorylieren (Whitmarsh, Cavanagh et al. 1998; Rzczkowski, Beuerlein et al. 2011). Wie p38 wird auch JNK im Rahmen einer Infektion mit SARS-CoV, MHV oder IGV aktiviert (Banerjee, Narayanan et al. 2002; Fung, Liao et al. 2014). Für SARS-CoV wurde darüber hinaus gezeigt, dass die JNK Aktivierung proviraler Natur ist, da eine inhibitorvermittelte Blockierung von JNK die Replikation hemmt (Mizutani, Fukushima et al. 2005). Darüber hinaus reicht die Überexpression des N Proteins aus, um eine Phosphorylierung von JNK nicht aber von p38 zu induzieren, sodass für die beiden Kinasen unterschiedliche Aktivierungsmechanismen verwendet werden könnten (Mizutani, Fukushima et al. 2006). Im Rahmen einer IBV Infektion konnte gezeigt werden, dass die JNK Aktivierung die Apoptose der Wirtszelle einleitet, sodass JNK im Rahmen einer Coronavirusinfektion mehrere Funktionen wahrnehmen könnte, was bereits in virusunabhängigen Systemen gezeigt wurde (Ventura, Hubner et al. 2006; Fung, Liao et al. 2014). Einer der möglichen alternativen Aktivierungswege von JNK verläuft *TNF receptor associated factor 2* (TRAF2) abhängig über die Stimulation des IRE1 Rezeptors des ER Stress Signalweges (Urano, Wang et al. 2000; Ogata, Hino et al. 2006).

Darüber hinaus aktiviert TAK1 als drittes den *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) Signalweg. Dafür induziert es je zwei Phosphorylierungen an *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit α* und β (IKK α /IKK β), die zusammen mit *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit γ* (IKK γ oder NEMO) den IKK-Komplex bilden (Ninomiya-Tsuji, Kishimoto et al.

1999). Dieser wiederum induziert die Phosphorylierung von *inhibitor of κ B* (I κ B) an den Serinen 32 und 36, welches im basalen Zustand NF- κ B Proteine bindet und dadurch eine Kerntranslokation verhindert. Die Phosphorylierung dient als Markierung für eine K48 verknüpfte Ubiquitinierung von I κ B, welches daraufhin proteasomal degradiert wird (Ben-Neriah 2002). Ohne den Inhibitor transloziert NF- κ B in den Zellkern, wo es als Masterregulator an Enhancer und Promotoren bindet, und dadurch die transkriptionelle Aktivierung einer Vielzahl von Genen bewirkt (Jurida, Soelch et al. 2015). Obwohl der NF- κ B Signalweg einen essentiellen Teil der Zytokinantwort darstellt, wurde dessen Funktionen im Rahmen einer Coronavirusinfektion bisher kaum untersucht. Im Rahmen einer TGEV Infektion konnte gezeigt werden, dass es zu einer NF- κ B p65 Translokation in den Zellkern kommt, der mit einer NF- κ B p65 Phosphorylierung korreliert. Diese Aktivierung wurde dabei über die zytosolischen Rezeptoren für doppelsträngige RNA *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma differentiation antigen 5* (MDA5) vermittelt (Ding, An et al. 2017). Ein ähnliches Ergebnis konnte im Rahmen einer MHV Infektion beobachtet werden (Li, Liu et al. 2010). Für das SARS-CoV wurde ebenfalls eine Kerntranslokation von p65 beobachtet, doch der zugrundeliegende Mechanismus wurde bisher nicht aufgeklärt (DeDiego, Nieto-Torres et al. 2014). Generell scheint es eine Verknüpfung zwischen dem NF- κ B Signalweg und der Replikation von Coronaviren zu geben, aber die genauen Zusammenhänge sind dabei bisher kaum verstanden.

Die IL-1 induzierten Genexpressionsänderungen gehen damit prinzipiell auf zwei Mechanismen zurück. Zum einen kommt es zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die eine transkriptionelle Genexpressionsänderung bewirken. Zum anderen kommt es zu einer Stabilisierung der mRNAs verschiedener Zielgene, indem die mRNA Abbauraten verändert werden. Einer der am stärksten in Folge eines IL-1 Stimulus induzierten Gene ist das Chemokinen *Interleukin-8* (IL8). Dieses fungiert als sekundärer Entzündungsmediator und vermittelt die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten, die daraufhin aus den Blutgefäßen in das entzündete Gewebe einwandern (Gaestel, Kotlyarov et al. 2009). Obwohl Infektionen mit verschiedenen Coronaviren in der Regel auch die klassischen Kinasen des IL-1 Signalweges aktivieren, wurde bisher kaum untersucht, welche Prozesse zu dieser Aktivierung führen. Da die daraus folgende Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen Immunprozesse aktiviert, die in den extremsten Fällen zu pathophysiologischen Veränderungen und dem Tod der infizierten Individuen führen, ist es wichtig weitere Einblicke in diese Prozesse zu gewinnen, um Strategien für medikamentöse Behandlungen zu generieren (zusammengefasst in Abbildung 4).

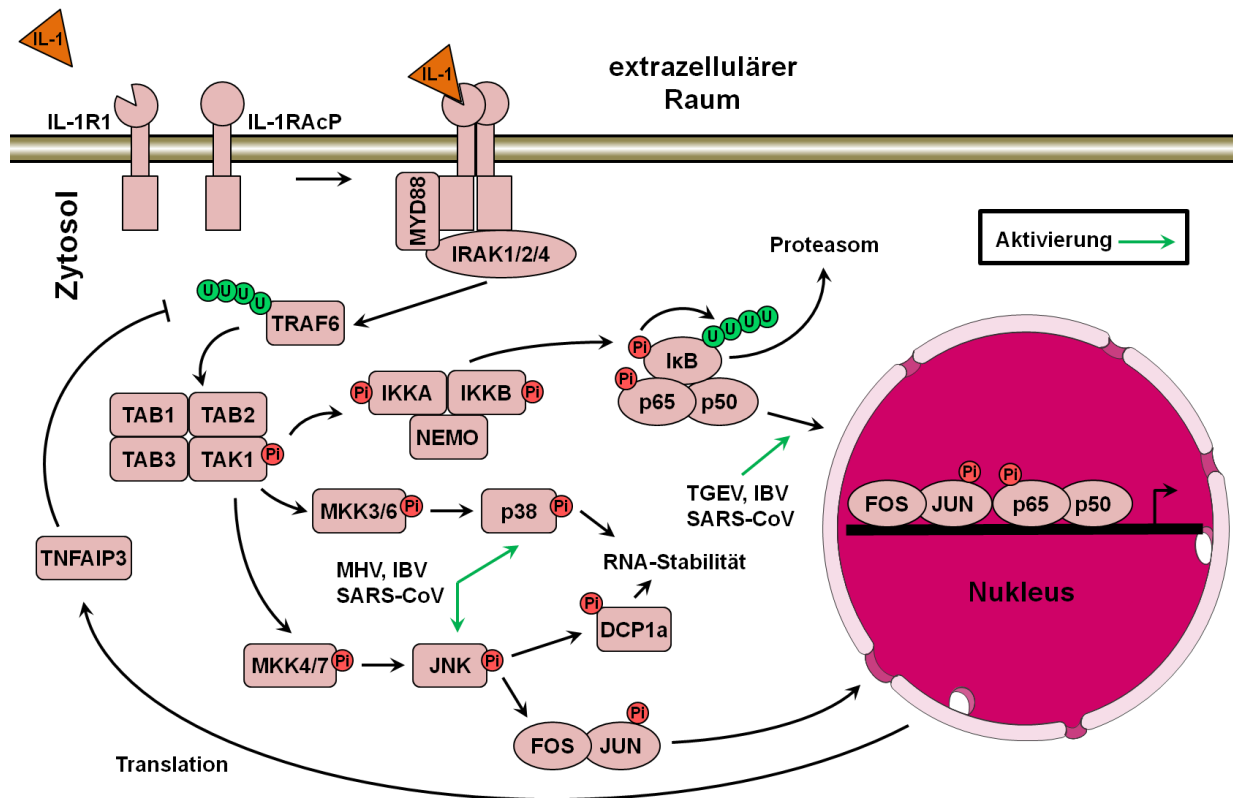


Abbildung 4: Schematische Darstellung des IL-1 Signalweges. Bindet der IL-1 Rezeptor seinen Liganden, kommt es zur Rekrutierung von IL-1RAcP. Dadurch entsteht der aktive Rezeptorkomplex, welcher MYD88 und die Kinasen IRAK1/2/4 rekrutiert, die wiederum die Aktivierung von TRAF6 vermitteln. TRAF6 ist in der Lage sich selbst mit K63 verknüpften Ubiquitinketten zu modifizieren, welche es aber auch auf weitere Proteine in der Signalkaskade übertragen kann. Dies aktiviert den TAK/TAB Komplex, welcher als initiale Kinase die drei Achsen des IL-1 Signalweges steuert, an deren Enden die Phosphorylierung von p38 und JNK, sowie die Kerntranslokation von AP-1 und NF- κ B Transkriptionsfaktoren steht (JUN, FOS, p65 und p50). Dadurch kommt es zu einer Vielzahl an transkriptionellen Regulationen, wozu auch die Synthese von TNFAIP3 gehört, welches TRAF6 deubiquitiniert und damit den IL-1 Signalweg wieder deaktiviert. Die bekannten Einflüsse verschiedener Coronaviren sind mit grünen Pfeilen dargestellt. Pi = Phosphorylierung, U = Ubiquitin

2.3 mRNA Abbaumechanismen

Die transkriptionsfaktorabhängige Expressionsveränderung spezifischer Gene in Folge eines Stimulus stellt einen essentiellen Regulationsmechanismus dar. Darüber hinaus können Zellen allerdings auch auf anderen Ebenen mRNA *steady-state* Level beeinflussen. Neben hochspezifischen Degradationsmechanismen, wie dem *zinc finger CCCH-type containing 12A* (ZC3H12A) abhängigen Abbau der *Interleukin-6* (IL6) mRNA, zählen dazu auch mRNA Stabilitätsänderungen auf Basis von mRNA Modifikationen, sowie der generelle Stabilitätsänderung von mRNA Subpopulationen, die unter anderem über regulatorische Elemente in den mRNA Spezies vermittelt werden kann (Matsushita, Takeuchi et al. 2009; Ke, Pandya-Jones et al. 2017; Plass, Rasmussen et al. 2017). Dabei

wird geschätzt, dass bis zu 50% der Änderungen von mRNA Abundanz in Folge eines Stimulus auf Änderungen der mRNA Stabilität und nicht auf transkriptionelle Aktivierung beziehungsweise Reprimierungen zurückgehen (Cheadle, Fan et al. 2005).

Der zytoplasmatische mRNA Abbau selbst kann in zwei Mechanismen eingeteilt werden. Der erste Mechanismus verläuft über einen 5'-3' Abbau und wird vom *decapping*-Komplex initiiert. Der zweite Mechanismus hingegen verläuft über einen 3'-5' Abbau und wird vom Exosom vermittelt. In beiden Fällen muss allerdings zunächst der poly-Adenin-Schwanz der mRNA auf eine kritische Länge verkürzt werden. Dies stellt einen essentiellen Schritt dar, um das Schicksal eines mRNA Moleküls zu determinieren und wird von einer Reihe an Proteinen beeinflusst, die in der Lage sind den poly-Adenin-Schwanz zu binden, um ihn zu stabilisieren, zu verlängern, oder zu verkürzen (Goldstrohm and Wickens 2008). Dessen Abbau wird hauptsächlich durch den CCR4-NOT und den PAN2-PAN3 Komplex vermittelt (Wahle and Winkler 2013).

Wird die kritische Länge des poly-Adenin-Schwanzes erreicht, führt dies zur Dislokation der *poly(A) binding proteins* (PABP). Dadurch wird das 3'-Ende der mRNA frei, sodass der Kern des Exosoms, bestehend aus sechs fassartig angeordneten Untereinheiten und drei daran gebundenen *cap* Untereinheiten, an dieses Binden kann (Chlebowski, Lubas et al. 2013). Zusammen mit den Ribonukleasen DIS3 und RRP6 wird dadurch der mRNA Abbau vom 3'-Ende eingeleitet. Das zurückbleibende 5'-*cap* (m7GpppG) wird anschließend von *decapping enzyme, scavenger* (DCPS) hydrolysiert (Milac, Bojarska et al. 2014).

Auf das Unterschreiten der kritischen Länge des poly-Adenin-Schwanzes kann auch die Bindung des *like Sm1-7* (LSM1-7) Komplexes folgen. Dieser besteht aus sieben Untereinheiten, die in der Quartärstruktur einen heptameren Ring bilden. Der LSM1-7 Komplex rekrutiert außerdem *protein interacting with APP tail-1 like 1* (PATL1) als regulatorische Untereinheit (Marnef and Standart 2010). In Folge dessen kommt es zu einer Rekrutierung des *decapping*-Komplexes an das 5'-*cap* der mRNA (Nissan, Rajyaguru et al. 2010). Der Kern dieses *decapping*-Komplexes besteht in höheren Säugetieren aus der hydrolytischen Untereinheit *decapping mRNA 2* (DCP2), der regulatorischen Untereinheit *decapping mRNA 1a* (DCP1a) und dem Ko-Faktor *enhancer of decapping 4* (EDC4), der die Bindung zwischen DCP2 und DCP1a stabilisiert (Chang, Bercovich et al. 2014). Darüber hinaus sind weitere Proteine wie *enhancer of decapping 3* (EDC3) an der *decapping*-Reaktion beteiligt (Tritschler, Eulalio et al. 2007). Nach der Hydrolyse des 5'-*cap* wird die RNA durch die 5'-3' *exoribonuclease 1* (XRN1) degradiert (Jones, Zabolotskaya et al. 2012)(zusammengefasst in Abbildung 5).

2 Einleitung

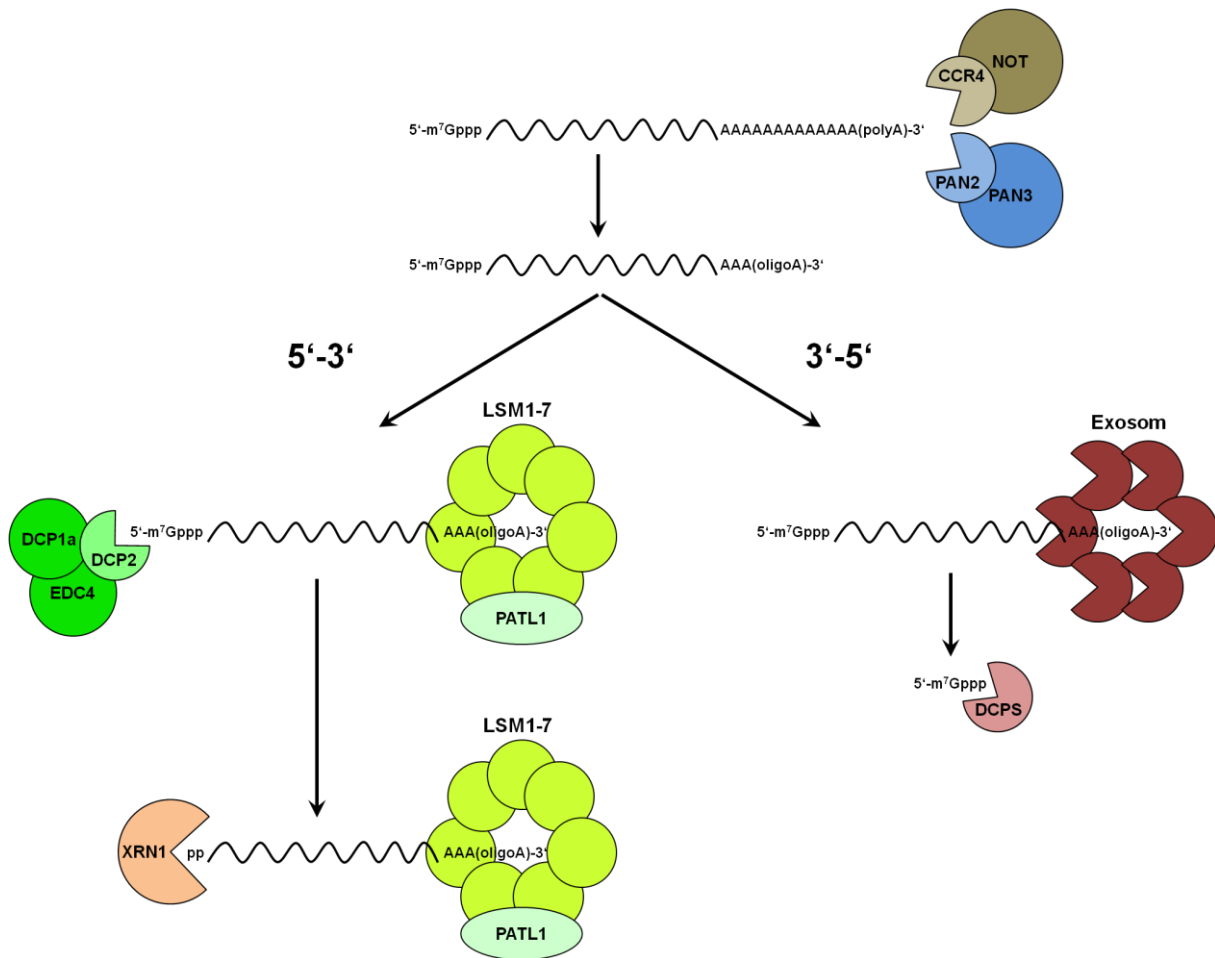


Abbildung 5: Schematische Darstellung der zellulären RNA Abbaumechanismen. Der nukleolytische Abbau von mRNA beginnt mit der Verkürzung des Poly-Adenin-Schwanzes, was vom PAN2-PAN3-, oder vom CCR4-NOT Komplex vermittelt werden kann. Erreicht der Poly-Adenin-Schwanzes eine kritische Länge, kommt es zum Abbau der mRNA in 5'-3' oder in 3'-5' Richtung. Der 3'-5' Abbau wird durch das Exosom vermittelt, an dessen Ende die Hydrolyse des 5'-cap durch DCPS steht. Beim 5'-3' vermittelten Abbau wird der verbliebene Oligo-Adenin-Schwanz zunächst vom LSM Komplex gebunden, was die Rekrutierung des *decapping*-Komplexes bestehend aus DCP1a, DCP2 und EDC4 vermittelt. Nach der Hydrolyse der 5'-cap Struktur degradiert XRN1 die verbleibende mRNA vollständig.

2.3.1 P-bodies

Die für die *decapping*-Reaktion relevanten Faktoren lokalisieren nicht nur im Zytoplasma, sondern kommen zusätzlich in definierten Strukturen innerhalb des Zytoplasmas vor, die *processing-bodies* (*P-bodies*) genannt werden (Parker and Sheth 2007). Diese Strukturen sind evolutionär konserviert und können in Hefen, in Pflanzen, sowie in Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei *P-bodies* nicht um klassische Zellkompartimente, da sie keine eigene Membranhülle besitzen (Eystathioy, Chan et al. 2002; Yang, Jakymiw et al. 2004). Neben den

Decappingfaktoren enthalten *P-bodies* zusätzlich RNA in Form von mRNA und miRNA, weswegen angenommen wird, dass es sich um RNA Abbau relevante Strukturen handelt (Kulkarni, Ozgur et al. 2010).

Diese Annahme wird allerdings kontrovers diskutiert, da auch gezeigt werden konnte, dass ein *P-body* als Speicherort für nicht translatierte mRNA dienen kann (Teixeira, Sheth et al. 2005). Dabei regulieren Zellen die Anzahl und die Größe ihrer *P-bodies* dynamisch. Während der Mitose werden sie komplett aufgelöst, während ihre Anzahl durch einen IL-1 α Stimulus zunimmt (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011; Aizer, Kafri et al. 2013). Außerdem konnte im Hefesystem gezeigt werden, dass ein *knockout* der 5'-3' Nuklease XRN1 zu einer Zunahme der Anzahl und der Größe von *P-bodies* führt (Teixeira, Sheth et al. 2005). Generell scheint es einen direkten Zusammenhang zwischen *P-bodies* und der Menge an zellulär verfügbarer translatierbarer mRNA zu geben, da eine Behandlung mit RNase oder dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D zu einer Auflösung der *P-bodies* führt (Cougot, Babajko et al. 2004; Teixeira, Sheth et al. 2005; Eulalio, Behm-Ansmant et al. 2007). Erhöht man allerdings die Menge an translatierbarer mRNA, die zusätzlich nicht *decapping*-vermittelt abgebaut werden kann, erhöht sich auch die Anzahl und die Größe der *P-bodies* (Teixeira, Sheth et al. 2005). Dies wird weiterhin dadurch unterstützt, dass bisher nur ein Elongationsinitiationsfaktor (eIF4E) innerhalb von *P-bodies* identifiziert werden konnte. Dieser liegt dabei in Assoziation mit seinem inaktivierenden Ko-Faktor vor (Andrei, Ingelfinger et al. 2005; Ferraiuolo, Basak et al. 2005; Barbee, Estes et al. 2006). Da eIF4E direkt die 5'-cap Struktur bindet und damit für die Hydrolyse durch DCP2 unzugänglich macht, unterstützt dies die Annahme, dass *P-bodies* neben dem direkten Abbau, auch an der Lagerung von mRNA beteiligt sind.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der *decapping*-vermittelte mRNA Abbau auch ohne die Anwesenheit von mikroskopisch sichtbaren *P-bodies* stattfindet (Decker, Teixeira et al. 2007).

Darüber hinaus können *P-bodies* Faktoren weiterer RNA Abbaumechanismen enthalten. So wurde in Hefen gezeigt, dass es zu einer Anreicherung von Proteinen des *nonsense mediated decay* (NMD) kommt, wenn den Zellen Komponenten des *decapping*-Komplexes wie DCP1, DCP2 oder XRN1 fehlen (Unterholzner and Izaurralde 2004; Sheth and Parker 2006).

Zusätzlich ist es bekannt, dass Argonaut Proteine direkt mit *decapping*-Faktoren interagieren können. Diese waren dabei an miRNA gebunden und lokalisierten in *P-bodies*, was impliziert, dass miRNAs die Translation ihrer Ziel mRNA nicht nur direkt inhibieren, sondern sie auch in *P-bodies* transportieren, wo sie entweder abgebaut oder gelagert werden. In jedem Fall stehen sie der Translation an Ribosomen dadurch nicht mehr zur Verfügung (Liu, Rivas et al. 2005; Meister, Landthaler et al. 2005; Pillai 2005; Rehwinkel, Behm-Ansmant et al. 2005).

Obwohl das vollständige Funktionsspektrum von *P-bodies* bisher nicht aufgeklärt wurde, gibt es eine Vielzahl an Studien, die belegen, dass Viren *P-bodies* und deren Komponenten beeinflussen oder sogar deren Proteine für ihre Replikation benötigen. So lösen sich *P-bodies* im Verlauf der Infektion mit den beiden Enteroviren Poliovirus und Coxsackievirus B3 auf. Dies geht einher mit der

Degradation der *P-body* Komponenten XRN1, DCP1a und *poly(A) specific ribonuclease subunit 3* (PAN3), wobei der Verlust von PAN3 ausreichend sein könnte, um die *P-bodies* aufzulösen, da die Deadenylierung einer mRNA eine Voraussetzung für den Transport in *P-bodies* ist (Zheng, Ezzeddine et al. 2008). Ohne eine funktionelle Deadenylierungsreaktion könnte der *pool* an *P-body* kompetenten mRNA Molekülen sinken, was eine Auflösung der *P-bodies* zur Folge hätte (Dougherty, White et al. 2011).

Interessanterweise greifen Rotaviren ebenfalls die Proteine PAN3, DCP1a und XRN1 an, mit der Folge, dass sich *P-bodies* auflösen. Im Laufe der Infektion kommt es zu einer Degradation von PAN3. DCP1a und XRN1 hingegen werden durch einen bisher unbekannten Mechanismus in den Zellkern transportiert und stehen auf diese Weise im Zytoplasma nicht mehr zur Verfügung (Bhowmick, Mukherjee et al. 2015).

Auch eine Infektion mit dem insektenspezifischen *cricket paralysis virus* führt zu einer Auflösung der *P-bodies*, wobei nicht vollständig geklärt ist, ob es sich um eine vollständige Auflösung handelt, oder ob einzelne Proteinkomponenten die *P-bodies* verlassen (Khong and Jan 2011).

Das *nonstructural protein 1* (NS1) der Influenzaviren interagiert direkt mit der essentiellen *P-body* Komponente *like SM 14A* (LSM14A), was ebenfalls die Struktur von *P-bodies* zerstört. Dadurch verhindert das Virus die Lokalisation seiner RNA in *P-bodies*, wo sie für die Translation nicht mehr zur Verfügung stehen würde (Mok, Song et al. 2012).

Andere Viren hingegen sorgen nicht für eine Auflösung der *P-bodies*, sondern machen sich einzelne Komponenten für ihre Replikation zu nutze. Das West-Nil-Virus sequestriert beispielsweise die Proteine LSM1, *trinucleotide repeat containing 6A* (TNRC6A oder GW182), *DEAD-box helicase 3* und 6 (DDX3, DDX6) und XRN1 zu den viralen Replikationskomplexen, wobei dies nicht zur vollständigen Auflösung der *P-bodies* führt (Chahar, Chen et al. 2013). Gleiches wurde für DDX6 und das verwandte Dengue Virus gezeigt (Ward, Bidet et al. 2011). Durch einen *knockdown* von DDX6 sinkt die Replikationsrate, was zeigt, dass die Komponenten des *decapping*-Komplexes essentiell für eine optimale Replikation dieser Viren sind.

Für Flaviviren konnte gezeigt werden, dass sie ein RNA-Fragment synthetisieren (small fragment RNA = sfRNA), welches eine Pseudoknotenstruktur ausbildet, die von der 5'-3' Nuklease XRN1 nicht aufgelöst werden kann. Dadurch wird der RNA-Abbau inhibiert und es kommt zur Akkumulation von endogener mRNA ohne 5'-cap (Pijlman, Funk et al. 2008; Silva, Pereira et al. 2010; Moon, Anderson et al. 2012). Bei Viren, die keine sfRNA mehr synthetisieren können, sinkt die Replikationsrate, was eine antivirale Funktion des 5'-3' mRNA Abbaumechanismus impliziert.

Für Hepatitis C Viren konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls *P-bodies* auflösen. Dies scheint jedoch kein relevanter Prozess für die Replikation zu sein, da ein *knockdown* von LSM14A und der damit einhergehende Verlust von *P-bodies* die Replikation nicht beeinflusste (Perez-Vilaro, Scheller et al. 2012). Nichtsdestotrotz sequestriert auch das Hepatitis C Virus *P-body* Komponenten wie DDX6, LSM1, PATL1, AGO2 und XRN1 in virale Replikationskompartimente, was essentiell für eine

optimale Replikation zu sein scheint (Ariumi, Kuroki et al. 2007; Ariumi, Kuroki et al. 2011; Pager, Schutz et al. 2013).

Das Verhalten von *P-bodies* in Rahmen einer Coronavirus Infektion wurde bisher nur für das MHV untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl TNRC6A positiver *P-bodies* nach sechs Stunden zunimmt (Raaben, Groot Koerkamp et al. 2007). Da jedoch nur ein *P-body* Marker zu einem relativ frühen Zeitpunkt untersucht wurde, ist nicht klar, ob lediglich der Faktor TNRC6A in die *P-bodies* rekrutiert wurde, oder ob es sich tatsächlich um eine Zunahme handelt. Auch wenn darüber hinaus bisher keine derartigen Untersuchungen für Coronaviren durchgeführt wurden, zeigen die Befunde in verschiedenen weiteren RNA-Viren, dass *P-bodies* und Komponenten des *decapping*-Komplexes für eine Vielzahl an Viren essentiell sind. Dabei können je nach Virus sowohl pro-, als auch antivirale Funktionen wahrgenommen werden. Die bloße Tatsache, dass Viren im Laufe ihrer Evolution vielfältige Mechanismen entwickelt haben, um die Funktion von *P-body* Proteinen zu beeinflussen, rechtfertigt weitere Studien in diesem Feld.

2.3.2 Die *decapping*-Faktoren DCP1a und EDC4

In Hefen besteht der Kern des *decapping*-Komplexes aus den Proteinen DCP1 und DCP2, wobei DCP1 die regulatorische und DCP2 die katalytische Untereinheit darstellt (van Dijk, Cougot et al. 2002). In höheren Säugetieren gibt es zwei homologe Formen von DCP1 (DCP1a und DCP1b), wobei lediglich 31% der Aminosäuresequenzen identisch sind. Obwohl es kaum Informationen zu den funktionellen Unterschieden der beiden Formen gibt, beschränkt sich der Großteil der Forschung auf DCP1a (Franks and Lykke-Andersen 2008). Als regulatorische Untereinheit des *decapping*-Komplexes, werden über DCP1a stimulusabhängige Signale für die Regulation der mRNA Abbaurate integriert. So kommt es im Rahmen einer IL-1 α Stimulation zu einer verstärkten JNK abhängigen Phosphorylierung an den Serinen 315 und 319. Dies ist assoziiert mit einer Erhöhung der *P-body* Anzahl, wobei die phosphorylierte Form primär in *P-bodies* nachgewiesen werden kann (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Die Phosphorylierungen dieser Serine werden auch im Rahmen einer *respiratory syncytial virus* (RSV) Infektion ERK1/2 abhängig verstärkt, was für die Regulation der *IL8* mRNA Expression relevant zu sein scheint (Dickey, Duncan et al. 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein DCP1a *knockdown* in Makrophagen zu einer schwachen Erhöhung der Lipopolysaccharid stimulierbaren *IL6* mRNA Expression führt, wohingegen die Menge an sekretiertem IL-6 sinkt, was zeigt, dass DCP1a ein relevanter Faktor für die Regulation der mRNA Abundanz und die Translation darstellt (Seto, Yoshida-Sugitani et al. 2015). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen, die *green fluorescence protein* (GFP) markiertes DCP1a überexprimieren, resistent gegen eine Poliovirus Infektion sind. Dieser Effekt ist dabei abhängig von einer GFP-DCP1a induzierten Phosphorylierung an Serin 51 von eIF2 α , die von *eukaryotic translation initiation factor 2*

alpha kinase 2 (EIF2AK2 oder auch *protein kinase R* (PKR)) vermittelt wird. Damit konnte ein weiterer direkter Zusammenhang zwischen DCP1a und der Regulation der Translation aufgezeigt werden (Dougherty, Reineke et al. 2014).

In höheren Säugetieren, ist die Interaktion zwischen DCP1a und DCP2 verglichen mit Hefen vermindert. Für eine vollständige Aktivierung des *decapping*-Komplexes bedarf es der Rekrutierung des Strukturproteins EDC4, welches die Bindung zwischen DCP1a und DCP2 stabilisiert (Chang, Bercovich et al. 2014). Eine Depletion von EDC4 in humanen Zellen führt zu einer verminderten *decapping*-Aktivität. Darüber hinaus liegt DCP1a im *decapping*-Komplex als asymmetrisches Trimer vor, wobei die drei DCP1a Moleküle C-Terminal miteinander und mit EDC4 interagieren (Chang, Bercovich et al. 2014). EDC4 dient nicht nur als Stabilisator des *decapping*-Komplexes, sondern stellt eine essentielle Komponente für die *P-body* Bildung dar, da der *knockdown* und der *knockout* zu einem vollständigen Verlust von *P-bodies* führt (Dissertation Ulas Tenekeci, AG Kracht)(Yu, Yang et al. 2005; Seto, Yoshida-Sugitani et al. 2015). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Exonuklease XRN1 mit EDC4 interagiert, sodass EDC4 als generelles Strukturprotein für den 5'-vermittelten Abbau von mRNA angesehen werden kann (Braun, Truffault et al. 2012). Überraschenderweise konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass EDC4 ein Resistenzfaktor für Virusinfektionen sein kann. Dabei wurde gezeigt, dass eine kurze Deletion von 26 Aminosäuren im EDC4 Protein von *Drosophila melanogaster* eine Resistenz gegen eine Infektion mit Rhabdoviren verursacht, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht aufgeklärt wurde (Cao, Magwire et al. 2016).

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl Coronaviren eine ernstzunehmende Gefahr für die Gesundheit darstellen können, sind die Informationen darüber, welche intrazellulären Prozesse von Coronaviren genutzt werden, noch sehr unzusammenhängend. Darüber hinaus gibt es bis heute keine spezifischen zugelassenen Medikamente. Infektionen bei Menschen und Tieren werden ausschließlich symptomatisch behandelt. Um einen detaillierteren Einblick in replikationsrelevante Prozesse zu erhalten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die globalen Veränderungen in der Wirtszelle auf der Ebene des Transkriptoms erfasst und analysiert werden. Darüber hinaus sollen interessante Kandidatengene und deren Funktionen über Inhibitor- und/oder *loss of function* Ansätze näher charakterisiert werden. Desweiteren wurden die Coronavirus induzierten Auswirkungen auf Proteinabundanzen und posttranslationale Modifikationen über markierungsfreie Massenspektrometrie untersucht und global ausgewertet. Anhand von Kandidatenproteinen sollten im Anschluss die Ergebnisse über *westernblot*-Analysen validiert werden, um im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Relevanz der Kandidatenproteine für die Virusreplikation näher zu charakterisieren.

3 Material

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Anti-Actinin (<i>mouse</i>) Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | Sigma-Aldrich (#A5044) |
| Anti-ATF3 (<i>rabbit</i>) Westernblot: 1:500 in 5% MP/TBST | Santa Cruz (#sc-583) |
| Anti- β -Actin (<i>mouse</i>) Westernblot: 1:10000 in 5% MP/TBST | Santa Cruz (#sc-4778) |
| Anti-DCP1a (<i>rabbit</i>) Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF: 1:100 | Abcam (#ab47881) |
| Anti-DCP1a (<i>rabbit</i>) Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF: 1:100 | Sigma Aldrich (#D5444) |
| Anti-DCP1a (<i>mouse</i>) Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF: 1:100 | Abnova (#H00055802-M06) |
| Anti-DCP2 (<i>rabbit</i>) Westernblot: 1:1000 in 5% BSA/TBST | Abcam (#ab28658) |
| Anti-EDC3 (<i>rabbit</i>) Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | Santa Cruz (#sc-135013) |
| Anti-EDC4 (<i>rabbit</i>) Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST IF: 1:100 | Cell Signaling (#2548) |
| Anti-EDC4 (<i>goat</i>) IF: 1:50 | Santa Cruz (#sc-137444) |
| Anti-EIF2a (<i>rabbit</i>) Westernblot: 1:1000 in 5% EDC4/TBST | Cell Signaling (#9722) |
| Anti-FLAG (<i>mouse</i>) Westernblot: 1:500 in 3% MP/TBST | Sigma-Aldrich (#F1804) |
| Anti-GAL4 (<i>rabbit</i>) | Geschenk von Prof. Dr. Lienhard Schmitz |

3 Material

| | |
|--|--|
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-GFP (<i>mouse</i>) | Roche (#11814460001) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-HA (<i>mouse</i>) | Sigma-Aldrich (#11583816001) |
| Westernblot: 1:500 in 5% MP/TBST | |
| IF: 1:100 | |
| Anti-IKKA (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-7218) |
| Westernblot: 1:500 in 5% MP/TBST | |
| Anti-IKKB (<i>mouse</i>) | Santa Cruz (#sc-8014) |
| Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-IkBa (<i>rabbit</i>) | Cell Signaling (#9242) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-JIP4 (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-134972) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-JNK (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-571) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-JUN (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-1694) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-KLF6 (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-7158) |
| Westernblot: 1:1000 in 3% BSA/TBST | |
| Anti-N Protein HCoV-229E (<i>mouse</i>) | Ingenasa (Batch 250609) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| IF: 1:100 | |
| Anti-NEMO (<i>mouse</i>) | BD Bioscience (#611306) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-NF-κB p65 (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-8008) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| IF: 1:100 | |
| Anti-NSP8 (<i>rabbit</i>) | Geschenk von Prof. Dr. John Ziebuhr |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-MYC (<i>mouse</i>) | Roche (#11667 149001) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| IF: 1:100 | |
| Anti-p38 (<i>rabbit</i>) | Cell Signaling (#9212) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-phospho DCP1a Serin 315 (<i>rabbit</i>) | Pickcell (Serum Fraktion B, AG Kracht) |

3 Material

| | |
|--|-------------------------|
| Westernblot: 1:300 in 5% MP/TBST | |
| Anti-phospho EDC4 Serin 741 (<i>rabbit</i>) | Eurogentec |
| Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-phospho EIF2a Serin 51 (<i>rabbit</i>) | Cell signaling (#9721) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-phospho IKKA Serin 176/180 und IKKB Serin 177/181 (<i>rabbit</i>) | Cell signaling (#2697) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-phospho IκBα Serin 32 (<i>rabbit</i>) | Cell Signaling (#2859) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-phospho JIP4 Threonin 217 (<i>rabbit</i>) | Eurogentec |
| Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-phospho JNK Threonin 183/Tyrosin 185 (<i>rabbit</i>) | Cell Signaling (#9251) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-Phospho JUN Serin 73 (<i>rabbit</i>) | Cell Signaling (#9164) |
| Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-phospho N Protein HCoV-229E Serin 145/149 (<i>rabbit</i>) | Eurogentec |
| Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-phospho N Protein HCoV-229E Serin 364/367 (<i>rabbit</i>) | Eurogentec |
| Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-phospho NF-κB p65 Serin 536 (<i>rabbit</i>) | Cell Signaling (#3033) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST | |
| Anti-phospho p38 Threonin 180/Tyrosin 182 (<i>rabbit</i>) | Zymed (#36-8500) |
| Westernblot: 1:100 in 3% BSA/TBST | |
| Anti-phospho RNA-PolymeraseII Serin 2 (<i>rabbit</i>) | Abcam, (#ab5095) |
| IF: 1:400 | |
| Anti-TNFAIP3 (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-166692) |
| Westernblot: 1:500 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-TRAF6 (<i>rabbit</i>) | Santa Cruz (#sc-7221) |
| Westernblot: 1:1000 in 5% BSA/TBST | |
| Anti-Tubulin (<i>mouse</i>) | Santa Cruz (#sc-8035) |

3 Material

Westernblot: 1:1000 in 5% MP/TBST

Anti-Ubiquitin (*mouse*)

Santa Cruz (#sc-8017)

Westernblot: 1:200 in 5% MP/TBST

Anti-XRN1 (*rabbit*)

Abcam (#ab70259)

Westernblot: 1:500 in 5% MP/TBST

IF: 1:50

3.1.2 Sekundärantikörper

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| Cy3 Anti- <i>mouse</i> IgG (<i>donkey</i>) | Merck Millipore (#AP192C) |
| Cy3 Anti- <i>rabbit</i> IgG (<i>donkey</i>) | Merck Millipore (#AP182C) |
| Cy5 Anti- <i>goat</i> IgG (<i>donkey</i>) | Abcam (#ab150131) |
| Dylight 488 Anti- <i>mouse</i> IgG (<i>donkey</i>) | ImmunoReagent (#DkxMu-003D488NHSX) |
| Dylight 488 Anti- <i>rabbit</i> IgG (<i>donkey</i>) | ImmunoReagent (#DkxRb-003D488NHSX) |
| HRP Anti- <i>mouse</i> IgG (<i>goat</i>) | Dako (#P0447) |
| HRP Anti- <i>rabbit</i> IgG (<i>goat</i>) | Dako (#P0448) |

3.2 Bakterienstämme

TOP10 E.Coli

F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74
recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697galU galK rpsL (StrR) e
ndA1 nupG

XL1 Blue E.Coli

F' Tn10(Tetr) proA +B + lacIqΔ(lacZ)M15I recA1 gyrA96
(Nalr) tbi-1bsdR17 (r-k m-k) glnV44 relA1 lac

3.3 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden über die Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma bezogen und waren von analytischer Qualität oder höher.

3.4 Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (CIAP; 1 U/ μ l) | ThermoFisher Scientific (# EF0654) |
| DpnI (10 U/ μ l) | ThermoFisher Scientific (#ER1701) |
| M MuLV Reverse Transkriptase (20 U/ μ l) | ThermoFisher Scientific (# EP0352) |
| Pfu DNA Polymerase (2,5 U/ μ l) | ThermoFisher Scientific (#EP0501) |
| RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/ μ l) | ThermoFisher Scientific (# EP0441) |
| RNase A (10 mg/ml) | ThermoFisher Scientific (# EN0531) |

3.5 Expressionsvektoren

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| pcDNA3.1 MYC LV | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pcDNA3.1 MYC DCP1a | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pcDNA3.1 MYC DCP1a K520-577R | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pcDNA3.1 MYC DCP1a K520-577R, MT3 | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pcDNA3.1 MYC DCP1a MT3 | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pcDNA3.1 MYC DCP1a Δ 517-582 | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pCIneo- λ N-HA-LV | AG Izaurralde/Tübingen; Heike Budde |
| pCIneo- λ N-HA-EDC4 | AG Izaurralde/Tübingen; Heike Budde |
| pCIneo- λ N-HA-EDC4 S741A | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pCIneo- λ N-HA-EDC4 S741D | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pCIneo- λ N-HA-EDC4 S741E | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pCIneo- λ N-HA-EDC4 Δ L719-S741 | AG Kracht/Gießen; Michael Poppe |
| pCR3.1 FLAG TRAF6 | AG Darnay/Texas |
| pCR3.1 FLAG TRAF6 C70A | AG Darnay/Texas |
| pDEST26-HIS LV | AG Niedenthal/Hannover |
| pDEST26-HIS Ubiquitin | AG Niedenthal/Hannover |
| peGFP-C1-LV | Clontech |
| peGFP-DCP1a | AG Kracht/Katharina Porada |
| peV HA JNK2 | AG Kracht/Gießen |
| peV HA JNK2 K55R | AG Kracht/Gießen |
| pFA GAL4 LV | AG Duyster/München, Sebastian Kuhn |

| | |
|--|-------------------------------------|
| pFA GAL4 DCP1a | AG Duyster/München, Sebastian Kuhn |
| pFA GAL4 DCP1a Δ D124-P390 | AG Duyster/München; Sebastian Kuhn |
| pGeneClip DCP1a shRNA Klon 4 | Quiagen |
| pGeneClip <i>non coding</i> (NC) shRNA | Quiagen |
| pLKO.1 shRNA TNFAIP3 | Sigma Aldrich (TRCN0000050959) |
| pSuper.puro | AG Kracht/Gießen |
| pSuper.puro shRNA p65 | AG Kracht/Gießen; Dr. Johanna Sölch |
| pX459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro) | Addgene (#48139) |
| pX459 p65 sgRNA | AG Schmitz/Gießen; Tabea Riedlinger |
| pX459 DCP1a sgRNA3 | AG Kracht/Gießen; Ulas Tenekeci |
| pX459 EDC4 sgRNA1 | AG Kracht/Gießen; Ulas Tenekeci |
| pX459 EDC4 sgRNA2 | AG Kracht/Gießen; Ulas Tenekeci |
| pX459 EDC4 sgRNA4 | AG Kracht/Gießen; Ulas Tenekeci |
| pX459 XRN1 sgRNA1 | AG Kracht/Gießen; Ulas Tenekeci |

3.6 Gebrauchsfertige Kits und Reagenzien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| 4% Paraformaldehydlösung in PBS | Santa Cruz (#sc-281692) |
| 4x Rotiload Auftragspuffer | Carl Roth (#K929.3) |
| Agilent RNA 6000 Nano/Pico Kit | Agilent Technologies (#5067-1513) |
| Amersham ECL TM Select Western Blotting Detection Reagent | GE Healthcare (#RPN2235) |
| Amersham ECL TM Western blotting Detection Reagent | GE Healthcare (#RPN2106) |
| Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit | Life Technologies (#12204-01) |
| dNTP Set | ThermoFisher Scientific (#R0192) |
| ECL-Filme (Fuji X-ray film SUPER RX) | Fujifilm (#4741019236) |
| EZview TM Red Anti-HA Affinity Gel | Sigma-Aldrich (#E6779-1ML) |
| Fast SYBR® Green Master Mix | Applied Biosystems (#4385612) |
| GFP-Trap®_A | Chromotek (#gta-20) |
| HBSS | PAN Biotech (#P04-32505) |
| Immobilion Western Chemiluminescent HRP-Substrate | Millipore (#WBKLS0500) |
| Lipofectamine® LTX with Plus TM Reagent | ThermoFisher Scientific (#15338100) |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Ni-NTA Agarose | Quiagen (#30210) |
| Nicht essentielle Aminosäuren (MEM Non-Essential Amino Acids solution 100x) | ThermoFisher Scientific (#11140050) |
| NucleoBond® PC500 Maxi Prep Kit | Macherey-Nagel (#740574.50) |
| NucleoSpin® Plasmid | Macherey-Nagel (#740588.250) |
| NucleoSpin® RNA II Kit | Macherey-Nagel (#740955.250) |
| DPBS | PAN Biotech (#P04-36500) |
| Protein A-Sepharose | GE Healthcare (#17-0780-01) |
| Protein G-Sepharose | GE Healthcare (#17-0618-02) |
| Random Hexamer Primer 0,2 µg/µl | Thermo Scientific (#S0142) |
| Roti®-PVDF-Membran | Carl Roth (#T830.1) |
| Roti®-Quant Bradford-Kit | Carl Roth (#K015.1) |
| Serum-freies Medium (Opti-MEM®) | ThermoFisher Scientific (#51985-034) |
| TaqMan® Fast Universal PCR Mastermix | Applied Biosystems (#4352042) |
| TaqMan® PreAmp Cells-to-CT™ Kit | ThermoFisher Scientific (#4387299) |
| Trypsin/EDTA Lösung | PAN Biotech (#P10-023100) |

3.7 Geräte

3.7.1 Divers

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|----------------------|
| Agilent 2100 Bioanalyzer | Agilent Technologies |
| AT 250 Waage | Mettler |
| FI 310 Waage | Fischer |
| MP-3000 Waage | Chyo |
| Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer | Peqlab |
| Qubit Fluorometer | Invitrogen |
| Sonifier 250 | Branson |
| Spectramax Plus Microplate Spectrophotometer | Molecular Devices |
| Thermomixer <i>comfort</i> | Eppendorf |
| Thermomixer <i>compact</i> | Eppendorf |
| XP205 DelaRange Waage | Mettler Toledo |

3.7.2 Mikroskope

| Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------|-------------------|
| CKX41 | Olympus |
| DM6000B (LMD6000) | Leica |
| DMi8 | Leica |
| DMIL | Leica |
| DMIRB | Leica |
| DMIRE2 | Leica |

3.7.3 PCR Thermocycler

| Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------------------|-------------------|
| 7500 Fast Real Time PCR System | Applied Biosystem |
| Thermocycler T Professional | Biometra |

3.7.4 Westernblot-Apparaturen

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|------------------------|
| <i>ChemiDocTM Touch Imaging System</i> | Bio-Rad |
| Elektrophorese <i>Power Supply</i> EPS 600, 601 und 3500 | Pharmacia Biotech |
| Filmentwicklermaschine Curix 60 | AGFA |
| <i>Gel iX Imager UV-Transilluminator</i> | INTAS |
| <i>Mighty Small II</i> Elektrophoresekammer | Hoefer |
| Owl P9DS Elektrophoresekammer | Owl Separation Systems |
| <i>PerfectBlue Semi-Dry-Blotter</i> | Peqlab Biotechnologie |

3.7.5 Zellkultur

| Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------------------------|-------------------|
| BBD 6220 CO ₂ Inkubator | Thermo Scientific |
| Brutschrank CO ₂ Autozero | Heraeus |

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472 | Thermo Scientific |
| Sterilwerkbank Safe 2020 | Thermo Scientific |

3.7.6 Zentrifugen

| Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------------------|-------------------|
| Avanti J-20 XP | Beckman Coulter |
| Optima™ TLX Ultrazentrifuge | Beckman Coulter |
| Sorvall RC5S Plus | Thermo Scientific |
| Tischzentrifuge 5415 R | Eppendorf |
| Tischzentrifuge 5424 | Eppendorf |
| Tischzentrifuge 5424 R | Eppendorf |
| TJ-25 Zentrifuge | Beckman Coulter |

3.8 Humane Zelllinien

| | |
|------------------------|--|
| A549 | Adenokarzinomzelllinie die von alveolaren Epithelzellen abstammt (ATCC, S1) |
| HeLa | epitheliale Zervixkarzinomzelllinie (ATCC, S1) |
| HeLa pX459 LV | HeLa Zellen die stabil mit dem Vektor pX459 LV transfiziert wurden |
| HeLa pX459 sgRNA p65 | HeLa Zellen die stabil mit dem Vektor pX459 p65 sgRNA transfiziert wurden |
| HeLa pX459 sgRNA DCP1a | HeLa Zellen die stabil mit dem Vektor pX459 DCP1a sgRNA3 transfiziert wurden |
| HeLa pX459 sgRNA EDC4 | HeLa Zellen die stabil mit den Vektoren pX459 EDC4 sgRNA1, pX459 EDC4 sgRNA2 und pX459 EDC4 sgRNA4 transfiziert wurden |

3 Material

| | |
|-----------------------|---|
| HeLa pX459 sgRNA XRN1 | HeLa Zellen die stabil mit dem Vektor pX459 XRN1 sgRNA1 transfiziert wurden |
| HEK293 IL-1R | Adenovirus transformierte embryonale Nierenzelllinie die zusätzlich stabil mit einem Expressionsvektor, der den Typ I IL-1 Rezeptor kodiert, transformiert wurde. Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan |
| HuH7 | epitheliale Karzinomzelllinie, die von Hepatozyten abstammt. (ATCC, S1) |

3.9 Inhibitoren

| Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------|---------------------------|
| GSK 2606414 (PERK) | Axon Medchem (#2233) |
| SB203580 (p38) | Calbiochem (#559389) |
| SP600125 (JNK) | Tocris Bioscience (#1496) |

3.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics hergestellt.

| Verwendung | Primer <i>sense</i> (5'-3') | Primer <i>antisense</i> (5'-3') |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Mutagenese EDC4 S741A | ccactgccctggcccaggacatccc | gggatgtcctggcccagggcagtgg |
| Mutagenese EDC4 S741D | ccactgccctggaccaggacatccc | gggatgtcctgtccagggcagtgg |
| Deletion EDC4 L719-S741 | gtggagccccctggggcaggacatccctga g | ctcagggatgtcctgccccaggggctc cac |
| EDC4 Sequenzierprimer | cccagggcctccatcaagcc | - |
| Mutagenese EDC4 S741E | ccactgccctggagcaggacatccc | gggatgtcctgtccagggcagtgg |
| SYBR green RT-qPCR ANKRD1 | acgccaagacagagaagga | ttctgccagtgtagcaccag |
| SYBR green RT-qPCR CHAC1 | tggattttcgggtacggctc | tggatgtcaccatcttgtcg |
| SYBR green RT-qPCR NSP8 (RNA1) | gctgttgcaaatggttctcac | gatgcacattcttaccatcattatcc |
| SYBR green RT-qPCR Spike | tttcaggtgatgtcacatacc | acaaactcacgaactgtcttagg |

(RNA2)

| | | |
|--|---|---|
| Mutagenese DCP1a L551R_I555S | Cagctccaggatacacgaatacatctaagc aagaatgattccagc | gctggaatcattcttgcttagatgtattcg tgtatcctggagctg |
| Mutagenese DCP1a F561R_L565S | Aagaatgattccagccgcctcagtacatctc atgaagtctacttg | caagtagacttcagatgtactgagg cggctggaatcattctt |
| Mutagenese DCP1a _{K520-577R} L551R_I555S | Cagctccaggatacacgaatacatctaagc cggaatgattccagc | gctggaatcattccggcttagatgtattc gtgtatcctggagctg |
| Mutagenese DCP1a _{K520-577R} F561R_L565S | Cggaatgattccagccgcctcagtacatctc atgaagtctacttg | caagtagacttcagatgtactgagg cggctggaatcattccg |
| SYBR green RT-qPCR AKTB | Accctgaagtaccccatcg | cagcctggatagcaacgtac |
| SYBR green RT-qPCR ATF3 | Gctgcaaagtgccgaaacaa | atacacgtgggccgatgaag |

3.11 Proteinmarker

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|----------------------------------|
| <i>PageRulerTM Prestaines Protein Ladder</i> | ThermoFisher Scientific (#26617) |
| <i>PageRulerTM Prestaines Protein Ladder Plus</i> | ThermoFisher Scientific (#26620) |
| <i>PierceTM Unstained Protein Marker</i> | ThermoFisher Scientific (#26610) |

3.12 Puffer & Lösungen

3.12.1 Kalziumphosphat Transfektion

| Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------------|--|
| HEBS (2x) | 280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ mit NaOH auf pH 7,12 einstellen und sterilfiltrieren |
| HeLa Schockmedium | DMEM-Vollmedium 10% (v/v) Glycerol |
| CaCl ₂ Lösung | 2 M CaCl ₂ sterilfiltriert |

3.12.2 Medien

| Medium | Zusammensetzung |
|--|--|
| DMEM-Vollmedium (Dulbecco's modified Eagle's medium) | 10% (v/v) FKS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin 2 mmol/l L-Glutamin |
| Einfriermedium | DMEM-Vollmedium 10% FKS (v/v) 10% DMSO (v/v) |
| LB-Medium | 10 g BactoTrypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt add. 1l ddH ₂ O autoklavieren |
| LB-Platten | 18,5 g Standard I-Nähragar (Merck) add. 0,5 l ddH ₂ O autoklavieren |
| TSS-Puffer | LB-Medium 10% Polyethylenglykol 6000 5% DMSO 50 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O |

3.12.3 Proteinlyse & Immunpräzipitation

| Puffer | Zusammensetzung |
|--|---|
| Speziallysepuffer | 10 mM Tris, pH 7,05 30 mM Natriumpyrophosphat 50 mM NaCl 1% Triton X-100 2 mM Na ₃ VO ₃ 50 mM NaF 20 mM β -Glycerophosphat 1 mg/ml Pepstatin 5 mg/ml Leupeptin 200 mM PMSF 1 mM Microcystin |
| Bohmann/Weiss-Lysepuffer (Weiss, Schneider et al. 2003) | 50 mM HEPES, pH 7,4 50 mM NaCl 1% (v/v) Tween 20 2,5 mM EGTA 1 mM EDTA 1 mM NaF 10 mM β -Glycerophosphat 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM PMSF 1x Proteaseinhibitormix 1 mM DTT |
| Bohmann/Weiss-Waschpuffer (Weiss, Schneider et al. 2003) | 50 mM HEPES, pH 7,4 450 mM NaCl 1% (v/v) Tween 20 2,5 mM EGTA 1 mM EDTA 1 mM NaF 10 mM β -Glycerophosphat 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM PMSF |

3 Material

| | |
|---|--|
| | 1x Proteaseinhibitormix 1 mM DTT |
| ChIP-Lysepuffer | 50 mM Tris, pH 8,1 1% (w/v) SDS 10 mM EDTA 1mM PMSF 1,5x Roche Proteaseinhibitor |
| ChIP-Dilutionspuffer | 16,7 mM Tris, pH 8,1 0,01% (w/v) SDS 1,2 mM EDTA 167 mM NaCl 1,1% (w/v) Triton X-100 |
| ChIP-Niedrigsalzpuffer | 20 mM Tris, pH 8,1 0,1% (w/v) SDS 2 mM EDTA 150 mM NaCl 1% Triton X-100 |
| ChIP-Hochsalzpuffer | 20 mM Tris, pH 8,1 0,1% (w/v) SDS 2 mM EDTA 500 mM NaCl 1% Triton X-100 |
| NET1 Lysepuffer (ohne EDTA) | 50 mM Tris, pH 7,5 10% (v/v) Glycerol 150 mM NaCl 0,1% Triton X-100 1x Roche Proteaseinhibitor |
| Puffer A (Guanidiniumhydrochlorid Lyse) | 6 M Guanidiniumhydrochlorid 0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 |

3 Material

| | |
|--|--|
| | 10 mM Imidazol |
| Puffer Ti (Guanidiniumhydrochlorid Lyse) | 25mM Tris, pH 6,8 20 mM Imidazol |
| Harnstoff Lysepuffer | 20 mM HEPES, pH 8,0 9 M urea 1 mM sodium Orthovanadat (aktiviert) 2,5 mM sodium Pyrophosphat 1 mM β -glycerol-phosphat |

3.12.4 TaqMan® PreAmp Cells-to-CT™ Kit

| Puffer | Zusammensetzung |
|-----------|---------------------------------|
| TE-Puffer | 10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA |

3.12.5 Westernblot

| Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------------------------|---|
| Blotpuffer (<i>Semi dry</i>) (1x) | 25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol |
| Laemmli-Laufpuffer (1x) | 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS |
| Ponceau-Rot Färbelösung | 0,1% (w/v) Ponceau S 5% (v/v) Essigsäure |
| Sammelgelpuffer | 1 M Tris, pH 6,8 |

3 Material

| | |
|----------------|-----------------------------------|
| TBS (10x) | 100 mM Tris, pH 7,4 1,5 M NaCl |
| TBST (1x) | TBS mit 0,05% (v/v) Tween 20 |
| Trenngelpuffer | 1 M Tris, pH 8,8 |

3.13 Rekombinante Proteine

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| Humanes rekombinantes IL-1a | Prof. Dr. Saklatvala, London, England |
| Humanes rekombinantes IL-1a | AG Kracht |

3.14 TaqMan Sonden

| Bezeichnung | Hersteller |
|----------------|---|
| <i>ATF3</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00231069_m1) |
| <i>CXCL2</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00236966_m1) |
| <i>DCP1a</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs01056065_m1) |
| <i>DDIT3</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00358796_g1) |
| <i>DNAJB9</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs01573477_g1) |
| <i>DUSP1</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00610256_g1) |
| <i>EGR1</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00152928_m1) |
| <i>GUSB</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs99999908_m1) |
| <i>HERPUD1</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs01124269_m1) |
| <i>IL6</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00174131_m1) |
| <i>IL8</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00174103_m1) |
| <i>TNFAIP3</i> | ThermoFischer Scientific (#Hs00234713_m1) |

3.15 Verbrauchsmaterial

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plastikwaren und Einwegmaterialien wurden über die Firmen Ansell, Brand, Eppendorf, Greiner, Neolab, Nerbe-Plus, Nunc, Omnilab, Roth, Ibidi oder Sarstedt bezogen.

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit DNA und RNA

4.1.1 Plasmidpräparation (Maßstab Mini)

Für die Plasmidpräparation wurden die Bakterien, welche das gewünschte Plasmid enthalten, in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden von der Bakteriensuspension 2 ml für die Plasmidpräparation eingesetzt. Die Präparation erfolgte mit dem *NucleoSpin® Plasmid Kit* von *Machery & Nagel* nach Herstellerangaben. Die DNA wurde je nach gewünschter Konzentration in 30-50 µl ddH₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.2 Plasmidpräparation (Maßstab Mini)

Die das gewünschte Plasmid tragenden Bakterien wurden aus einer Glycerindauerkultur oder aus dem Rest einer Kultur, welcher für die Plasmidpräparation im Maßstab Mini angesetzt worden ist, in 150 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 160 rpm wurde die gesamte Bakteriensuspension für die Präparation des Plasmids unter Verwendung des *NucleoBond® PC500 Maxi Kits* von *Macherey-Nagel* eingesetzt. Die Präparation erfolgte genau nach Herstellerangaben. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 200 – 500 µl ddH₂O aufgenommen, nach einer Konzentrationsbestimmung auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.3 RNA Präparation

Für die Isolierung der gesamten RNA aus humanen Zelllinien wurde das *NucleoSpin® RNA II Kit* von *Macherey-Nagel* verwendet. Die Herstellerangaben wurden genauestens eingehalten. Die Elution der RNA erfolgte in 50 µl ddH₂O. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

4.1.4 RNA Präparation aus Lasermikrodissektierten Zellen

Für die Isolierung der gesamten RNA aus A549 Zellen, die per Lasermikrodissektion isoliert wurden, wurde das *PicoPure® RNA Isolation Kit* von *Arcturus* verwendet. Die Herstellerangaben wurden genauestens eingehalten. Die Elution der RNA erfolgte in 10 µl ddH₂O. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

4.1.5 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmungen

Die Konzentration von DNA- und RNA Proben wurden standardmäßig mit Hilfe eines ND-1000 *Nanodrop®* bestimmt. Dafür wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Für RNA Proben aus Lasermikrodissektionsexperimenten hingegen, ist eine Nanodrop Bestimmung nicht sensitiv genug. Daher wurde in diesem Fall ein *RNA 6000 Pico® Kit* von *Agilent Technologies* verwendet. Die Herstellerangaben wurden dabei genauestens eingehalten.

4.2 Arbeiten mit humanen adhärenen Zelllinien

In dieser Arbeit wurden ausschließlich A549, HEK293 IL-1R, HeLa und HuH7 Zellen verwendet.

4.2.1 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die mit Trypsin/EDTA (PAN Biotech #P10-023100) abgelösten Zellen bei 500 g für 5 min bei Raumtemperatur sedimentiert, in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend über Nacht in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol befüllten *Nalgene-Cryo Freezing Container* bei -80°C gelagert und zur längeren Lagerung in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad erwärmt, in 10 ml Medium überführt und zur Entfernung des im Einfriermedium vorhandenen DMSO bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und in die gewünschte Zellkulturflasche überführt, in die frisches Medium vorgelegt wurde.

4.2.2 Kultivieren und Passagieren

Die verwendeten Zelllinien wurden in 75 oder 175 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und einer wassergesättigten Atmosphäre in DMEM Vollmedium mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte alle drei bis fünf Tage, sobald die Zellen einen zusammenhängenden (konfluenten) Zellrasen bildeten. Zu diesem Zweck wurde das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen, um die Zellen danach für 1 - 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C zu inkubieren. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, was gleichzeitig die Reaktion stoppt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche, in die frisches Medium vorgelegt wurde, überführt. Zum Auszählen der Zellen wurde außerdem eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Unter dem Mikroskop wurden die vier Großquadrate der Kammer ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\sum \text{aller gezählten Zellen}}{4} * 10^4$$

4.2.3 Stimulation und Ernte der Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit IL-1a (final 10 ng/ml), GSK2606414, SP600125 oder SB203580, wobei die verwendeten Konzentrationen in den Experimenten angegeben sind. Alle Stimulantien wurden dabei direkt in das Vollmedium der Zellen gegeben. Bei der Behandlung der Zellen mit den Kinaseinhibitoren und sich anschließender Infektion, wurden die Zellen mit den Inhibitoren für 1 h vorinkubiert. Fand die Stimulation oder Inhibierung in *µ-Slides VI* statt, wurde aus der entsprechenden Kammer mindestens 60 µl Medium abgenommen, mit der entsprechenden Substanz vermischt und erneut auf die Zellen gegeben. Zum Ernten der Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS abgelöst, anschließend für 5 min bei 500 g und 4°C abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

4.2.4 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen. Man unterscheidet zwischen einer transienten Transfektion, bei der das Plasmid in den Zellkern gelangt, sodass für einige Tage das gewünschte Gen exprimiert wird und einer stabilen Transfektion, bei der das eingeschleuste Expressionsplasmid in die chromosomale DNA integriert wird. Es gibt verschiedene

Transfektionsmethoden wie die DEAE-Dextran-Technik, die Elektroporation, die Liposomen-vermittelte Transfektion oder die Kalziumphosphat-Methode.

4.2.4.1 Transiente Kalziumphosphat-Transfektion

Bei Kalziumphosphat-Methode wird die DNA mit einer phosphathaltigen Pufferlösung und Kalziumchlorid gemischt. Es bilden sich feine Kalziumphosphatkristalle aus, die sich auf der Zelloberfläche der Zellen niederschlagen mit denen sie in Kontakt kommen. Über Endozytose gelangen die Kristalle dann in die Zelle. Die folgenden Angaben gelten für jeweils eine 60 cm² Schale. Erfolgte die Transfektion der Zellen in anderen Kulturgefäßen, wurden die einzelnen Volumina der Kulturfläche angepasst. Am Vortag der Transfektion wurden pro Schale 1×10^6 Zellen in 4 ml Medium ausgesät. Für jede Schale wurden 450 µl 2xHEBS, 500 µl H₂O und die gewünschte Menge DNA gemischt, die Bildung der Präzipitate erfolgte durch vorsichtige Zugabe von 63 µl einer kalten 2 M CaCl₂-Lösung. Die Suspension wurde nach 10 minütiger Inkubation auf die Zellen pipettiert, um diese dann für 6 h im Brutschrank zu inkubieren. Bei HeLa Zellen erfolgte anschließend ein Glycerolschock, um die Präzipitataufnahme zu steigern. Dazu wurden die Zellen für 1 min mit 1 ml Schockmedium inkubiert und anschließend zweimal mit warmem PBS gewaschen. Bei HEK293 IL-1R Zellen wurde nur zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für Überexpressionen für weitere 24 h kultiviert. Für shRNA vermittelte *knockdowns* wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für bis zu 72 h mit Puromycin selektiert (1 µg/ml). Je nach Zelldichte wurden die Zellen dabei passagiert.

4.2.4.2 Stabile Kalziumphosphat-Transfektion

HeLa Zellen wurden für sgRNA vermittelte *knockdowns/knockouts* mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Dazu wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen in 100 cm² Zellkulturschalen mit 15 ml DMEM gesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Dazu wurden 1,5 ml H₂O mit 1,35 ml HEBS 2x und 35 µg Plasmid-DNA vermischt. Die Bildung der Präzipitate erfolgte durch Zugabe von 189 µl einer kalten 2 M CaCl₂-Lösung. Die Suspension wurde nach 10 minütiger Inkubation auf die Zellen pipettiert, die dann für mindestens 6 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein Glycerolschock durchgeführt, um die Präzipitataufnahme zu steigern. Dazu wurden die Zellen für 1 min mit 5 ml Schockmedium inkubiert und anschließend zweimal mit warmem PBS gewaschen. Für die stabile Selektion wurden die Zellen nach 24 h mit Puromycin (1 µg/ml) behandelt, wobei diese Bedingung für die weitere Passage der Zellen beibehalten wurde.

Nach ca. drei Wochen hatten sich stabile Zelllinien gebildet, die auf die Effizienz des *knockdowns/knockouts* untersucht werden konnten.

4.2.4.3 Transiente *Lipofectamine*-Transfektion

A549 Zellen wurden für shRNA vermittelte *knockdowns* mit *Lipofectamine* LTX PLUS transfiziert. Dazu wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 15 ml DMEM gesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Dazu wurden 15,6 ng pGeneclip-shRNA bzw. die Vektorkontrolle, 15,6 µl Plus Reagenz in 3,9 ml Serum-freiem Medium (Opti-MEM) gemischt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde 46,9 µl *Lipofectamine* LTX dazugegeben, um den gesamten Reaktionsansatz für weitere 25 min bei Raumtemperatur inkubieren zu lassen. Von diesem Transfektionsansatz wurden 3,2 ml unter Schwenken auf die Zellen gegeben. Diese wurden anschließend für 24 h kultiviert. Es folgte ein Mediumwechsel mit gleichzeitiger Selektion für 72 h. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf 60 cm² Schalen verteilt. Nach weiteren 24 h ohne Puromycin wurden die Zellen infiziert oder stimuliert.

4.3 Arbeiten mit Proteinen

4.3.1 Lyse eukaryotischer Zellen

Die Herstellung von Ganzzelllysaten erfolgte zur Immundetektion im Westernblot sowie zur Durchführung von Ko-Immunpräzipitationen und *pulldown assays*. Für die Lyse der Zellen wurde je nach Verwendungszweck unterschiedliche Lysepuffer und -protokolle angewandt. Alle Schritte der Zelllyse wurden, wenn nicht anders angegeben auf Eis durchgeführt, um eine Degradation zellulärer Proteinen zu verhindern.

4.3.1.1 Speziallyse

Die Zelllyse erfolgte unter Einsatz des Speziallysepuffers, der das Detergenz Triton X-100 in einer Konzentration von 1% enthält, um sicher zu stellen dass die Zellen vollständig lysiert werden. Die Zellen wurden in einem der Zellmenge entsprechenden Volumen an Speziallysepuffer resuspendiert (für eine optisch 100% konfluente 60 cm² Schale 50 µl). Es folgte eine Inkubation der in dem Speziallysepuffer resuspendierten Zellen für 15 min. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei

15000 g wurde der Protein enthaltende Überstand abgenommen und direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet.

4.3.1.2 Bohmann/Weiss Lyse

Die geernteten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Bohmann/Weiss Lysepuffer lysiert und für 20 min auf Eis inkubiert (Weiss, Schneider et al. 2003). Zum vollständigen Aufschließen der Zellen erfolgte eine Sonifikation (2x 30 s) mittels *Branson Sonifier* bei 4°C. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Lysate für 20 min bei 100000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte direkt zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

4.3.1.3 ChIP Lyse

Die geernteten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen ChIP Lysepuffer lysiert und gevortext, bis kein Zellpellet mehr erkennbar war. Danach folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Zum vollständigen Aufschließen der Zellen erfolgte eine Sonifikation (1x 10 s) mittels Branson Sonifier. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 13000 g wurde der Protein enthaltende Überstand abgenommen und direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet, oder bei -20°C eingefroren.

4.3.1.4 NET1 Lyse (ohne EDTA)

Die geernteten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen NET1 Lysepuffer (ohne EDTA) lysiert und gevortext, bis kein Zellpellet mehr erkennbar war. Danach folgte eine Inkubation auf Eis für 15 min. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 15000 g wurde der Protein enthaltende Überstand abgenommen und direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet, oder bei -20°C eingefroren.

4.3.1.5 Guanidiniumhydrochlorid Lyse mit TCA Fällung

Die geernteten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Guanidiniumhydrochlorid Lysepuffer A lysiert und gevortext, bis kein Zellpellet mehr erkennbar war. Danach folgte eine

Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Zum vollständigen Aufschließen der Zellen erfolgte eine Sonifikation (1x 30 s) mittels Branson Sonifier bei 4°C. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 15000 g wurde der Protein enthaltende Überstand abgenommen und direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet, oder bei -20°C gelagert. Da sich das Guanidiniumhydrochlorid bei späteren *westernblot* Versuchen störend auswirkt, wurden nach der Proteinbestimmung Trichloressigsäure (TCA) Fällungen durchgeführt. Dafür wurden entsprechende Mengen der Probe 1:1 mit TCA (11% (v/v)) versetzt und solange auf Eis inkubiert, bis ein weißes Präzipitat ausfällt. Danach wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und es wurden 1000 µl Ethanol hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Proben erneut für 15 min bei 4°C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Pellets wurden offen bei Raumtemperatur inkubiert, bis das restliche Ethanol vollständig verdunstet war. Zuletzt wurden die Pellets in 2x Laemmli-Auftragspuffer (LAP) aufgenommen, für 10 min bei 95°C gekocht und danach bis zu Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.1.6 Harnstoff Lyse (für markierungsfreie Massenspektrometrie)

Die geernteten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Harnstoff Lysepuffer lysiert und gevortext, bis kein Zellpellet mehr erkennbar war. Zum vollständigen Aufschließen der Zellen erfolgte eine Sonifikation (4x 30 s) mittels *Branson Sonifier* bei 4°C. Danach folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 20000 g und 4°C. Zuletzt wurde der Protein enthaltende Überstand abgenommen und direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet, oder bei -80°C eingefroren.

4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteine in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm. Die Farbintensität ist abhängig von basischen Aminosäuren, insbesondere Arginin, und von aromatischen Aminosäuren. Mit dieser Methode lassen sich Proteinmengen von wenigen µg nachweisen. Für die Bestimmung der Konzentration ist es bei dieser Methode erforderlich eine Kalibrierkurve aufzunehmen. Für die Kalibriergerade wurde hier Rinder-Serumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0-35 mg/ml verwendet. Es wurde von jeder Probe und von jedem BSA-Standard eine Dreifachbestimmung in einer 96- Loch-Platte durchgeführt. Dabei wurden jeweils 100µl der zuvor mit PBS entsprechend verdünnten Probe mit 100µl des Bradford-Reagenzes versetzt. Ebenso wurde mit den BSA

Standardlösungen verfahren. Spätestens 5 min nach Zugabe des Bradford-Reagenzes wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Elisa Reader gemessen.

4.3.3 Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP)

Die Ko-Immunpräzipitation dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Hierbei wird mittels eines Antikörpers über Protein A- oder Protein G-Sepharose das jeweilige Antigen aus einer Proteinlösung (z.B. Zell-Lysat) isoliert. Zusätzlich zum Antigen selbst kann unter geeigneten Bedingungen auch ein Bindungspartner des Antigens präzipitiert werden und somit die Interaktion von Proteinen nachgewiesen werden.

4.3.3.1 Ko-IP nach Bohmann/Weiss

Für die Ko-IP wurden zunächst Antikörper an ein Gemisch aus Protein A-Sepharose und Protein G-Sepharose (1:1) gekoppelt. Dafür wurden die Sepharose *beads* zunächst zweimal in Lysepuffer equilibriert (1 min 15000 g, 4°C), um anschließend 1 – 5 µg Antikörper pro Ansatz hinzuzugeben. Als Kontrollen wurden IgG Antikörper verwendet. Diese Ansätze rotierten für 2 Stunden bei 4°C. Anschließend wurden die Lysate, welche eine Proteinmenge von 0,5 – 2 mg enthielt mit dem für die Lyse verwendeten Lysepuffer auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt. Danach wurde jede Probe mit 20 µl des mit Antikörpern gekoppelten Protein A/G-Sepharose Gemisches versetzt. Dieser Ansatz rotierte bei 4°C für mindestens 6 h. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Bohmann/Weiss Waschpuffer gewaschen (1 min 15000 g, 4°C). Zuletzt wurden die *beads* in 2x LAP aufgenommen, für 10 min bei 95°C gekocht und danach bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Alternativ wurde statt Protein A/G-Sepharose *beads* vorgekoppelte HA-*beads* oder GFP-*beads* verwendet. Für diese entfallen die IgG Kontrollen und das Koppeln der Antikörper.

4.3.3.2 Ko-IP mit ChIP Lyse

Für die Ko-IP wurden zunächst Antikörper an ein Gemisch aus Protein A-Sepharose und Protein G-Sepharose (1:1) gekoppelt. Dafür wurden die Sepharose *beads* zunächst zweimal in ChIP Dilutionspuffer equilibriert (1 min 2000 rpm, 4°C), um anschließend 1 µg Antikörper pro Ansatz hinzuzugeben. Als Kontrollen wurden IgG Antikörper verwendet. Diese Ansätze rotierten für 2 Stunden bei 4°C. Anschließend wurden die Lysate, welche eine Proteinmenge von 0,5 – 2 mg enthielten mit ChIP Dilutionspuffer auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt. Danach wurde jede Probe

mit 24 µl des mit Antikörper gekoppelten Protein A/G-Sepharose Gemisches versetzt. Dieser Ansatz rotierte bei 4°C für 2 h. Anschließend wurden die Proben zunächst zweimal mit Niedrigsalzpuffer gewaschen (1 min 2000 rpm, 4°C). Danach wurden die Proben unter den gleichen Bedingungen einmal mit Hochsalzpuffer gewaschen. Zuletzt wurden die *beads* in 2x LAP aufgenommen, für 10 min bei 95°C gekocht und danach bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.4 Präzipitation von HIS markierten Proteinen über Ni²⁺-NTA-Agarose (Guanidiniumhydrochlorid)

Bei der Präzipitation durch Nickel-NTA-Agarose handelt es sich um eine Methode, die zur Aufreinigung von Proteinen, welche einen Histidin-*tag* (6xHIS) tragen, eingesetzt werden kann. Dabei fungiert das Nickel-Ion (Ni²⁺) als Ligand, indem es über Nitrilotriessigsäure (NTA) an die Agarose gebunden wird. Da NTA vier von sechs Liganden-Bindungsstellen des Nickel-Ions besetzt, bleiben zwei freie Bindungsseiten für die Interaktion mit dem 6xHIS-*tag* verfügbar. Die entsprechenden Proteine binden über die Histidin-Reste an das Nickel-Ion und werden entsprechend an den Agarose-*beads* immobilisiert. Dies ermöglicht die Isolierung von HIS-*tag* fusionierten Proteinen unter denaturierenden oder nativen Bedingungen. Daher wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Bevor die Nickel-NTA Präzipitation durchgeführt werden konnte, erfolgte das Equilibrieren der Nickel-NTA Agarose. Dazu wurden je 50 µl Nickel-NTA-Agarose pro Probe dreimal mit jeweils 1 ml Puffer A gewaschen. Für die Präzipitation wurden die auf eine einheitliche Proteinmenge eingestellten Zelllysate mit je 50 µl der equilibrierten Nickel-NTA Agarose gemischt und rotierten für 2 h. Im Anschluss folgten 6 Waschschrte: zweimal mit 1 ml Puffer A, zweimal mit 1 ml Puffer A/TI (Verhältnis 1:3) und zweimal mit 1 ml Puffer TI (je 1 min 13000 g). Dabei wurden die Ansätze nach Zugabe des jeweiligen Puffers gevortext und rotierten anschließend für je 5 min. Zuletzt wurden die *beads* in 2x LAP aufgenommen, für 10 min bei 95°C gekocht und danach bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.5 *in vitro* Dephosphorylierung in NET1 Puffer (ohne EDTA)

Für die Dephosphorylierung wurden zunächst 60 µg Gesamtzelllysate (NET1 Lysepuffer ohne EDTA) auf ein Endvolumen von 92,4 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 36 µl 5x *caly intestine alkaline phosphatase* (CIAP) Puffer, sowie 3,6 µl 50x Roche Proteaseinhibitor und 3 µl CIAP (60 U) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz inkubierte anschließend für eine Stunde bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 45 µl 4x LAP gestoppt. Zuletzt wurden die Proben für 10 min bei 95°C gekocht und danach bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.6 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli mit *westernblot*

In einem Polyacrylamidgel werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Gesamtladung und ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Wird der Größenunterschied verschiedener Proteine durch die Ladung ausgeglichen, so können sich diese mit gleicher Geschwindigkeit auf die Anode zubewegen. Unter Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat), welches alle nicht kovalenten Bindungen innerhalb eines Proteins zerstört, das Protein dadurch denaturiert und negative Ladungen in die denaturierte Polypeptidkette einführt, stellt die Beweglichkeit der Proteine eine Funktion der Logarithmen ihrer molekularen Massen dar, sodass die Proteine nur nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Es wurden abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine 6-10%-ige Trenngele sowie 5%-ige Sammelgele verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem folgenden Schema, wobei exemplarisch nur die Zusammensetzung für ein 10%-iges Trenngel gezeigt ist. Bei einem anderen Polyacrylamidanteil des Gels wurde die Menge der eingesetzten Acrylamid-Stammlösung entsprechend angepasst.

Das Trenngel und das Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung:

| | Sammelgel (5%) | Trenngel (10%) |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| ddH ₂ O (ml) | 5,6 | 3,8 |
| 50% Glycerol (ml) | 0,9 | 2,4 |
| Sammelgelpuffer pH 6,8 (ml) | 1,25 | - |
| Trenngelpuffer pH 8,8 (ml) | - | 10,3 |
| 30% Acrylamid (ml) | 1,7 | 9 |
| 2% SDS (ml) | 0,5 | 1,35 |
| 40 % (µl) | 30 | 41 |
| (µl) | 20 | 27 |
| Gesamt (ml) | 10 | 27 |

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, welches nach dem Polymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet wurde. Die Proben enthielten entsprechend den Lysebedingungen LAP 1x oder 2x und wurden kurz anzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. In der Regel wurden zwischen 50 und 100 µg Protein aufgetragen (Ganzzelllysate). Vom jeweiligen Marker wurden zwischen 8 und 15 µl eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 50 mA pro Gel. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald der im LAP vorhandene Farbstoff Bromphenolblau das Ende der Trennstrecke erreichte. Das Gel wurde dann für einen *westernblot* eingesetzt.

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im *semi-dry*-Verfahren. Dazu wurde eine auf das Gel zugeschnittene, nach Herstellerangaben voraktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt und von oben und unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier (Stärke 1,2 mm) eingelegt, welches zuvor in 1x Blot-Puffer mit 20% Methanol getränkt wurde. Beim Aufbauen des Blots wurde vor allem darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden, welche den Transfer vom Gel auf die Membran behindern. Es wurde für 2 h bei 0,8 mA/cm² geblottet. Anschließend wurde der Proteintransfer durch Färben der Membran mit Ponceaurot überprüft und die Membran zu Dokumentationszwecken am *Gel iX Imager* fotografiert. Nach Entfärben der Membran mit TBST wurde diese, um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran zu besetzen, für 30 min bei Raumtemperatur in 5% Magermilch (angesetzt in TBST) blockiert. Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte mit Hilfe zweier Antikörper, wobei der erste Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet. Dieser wurde über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:10000 in 5% Magermilch in TBST oder in 5% BSA in TBST auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Blot kurz mit TBST gespült und dann viermal für je 5 min in TBST gewaschen, um den nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Dann wurde der Blot für 1 - 3 h bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper (1:3000 in 5 % Magermilch) inkubiert. Der Sekundärantikörper besitzt Speziesimmunglobulinspezifität für den Primärantikörper. Außerdem ist an den zweiten Antikörper eine *horseradish peroxidase* gekoppelt, welche die Umsetzung des Entwicklungsreagenzes katalysiert, wobei die dabei frei werdende Energie in Form von Licht abgegeben wird. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut kurz und dann viermal für je 5 min in TBST gewaschen, um den ungebundenen zweiten Antikörper zu entfernen. Es folgte eine Behandlung der Membran mit einem der Entwicklungsreagenzien nach Herstellerangaben. Die Lichtreaktion wurde über Röntgenfilme und die Entwicklermaschine *Curix60* der Firma Agfa oder das *ChemidocTM Touch Imaging System* der Firma Bio-Rad dokumentiert. Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurde die Software *Image Lab* der Firma Bio-Rad verwendet.

4.3.7 Markierungsfreie Massenspektrometrie

Für die markierungsfreie Massenspektrometrie wurden pro Bedingung 6 145 cm² Zellkulturschalen mit 5x10⁶ Zellen besät. Nach 24 h wurden die Zellen mit einer MOI von 1 infiziert, um die Proteinlysate nach der Ernte über Harnstoff Lyse zu generieren. Aliquots wurden anschließend zu *Cell Signaling Technology* (CST) verschickt, wo die weitere Vorbereitung der Proben, sowie die eigentliche Massenspektrometrie durchgeführt wurden. Die LC-MS/MS Analyse wurde mit einer *LTQ-Orbitrap-Elite* und einer *ESI-CID* durchgeführt. Dafür wurden die Peptide direkt auf eine 10 cm x 75 µm *PicoFrit* Kapillarsäule mit *Magic C18 AQ reversed-phase resin* geladen, wobei die Säule über 90 oder 150 min mit einem linearen Gradienten aus Acetonitril in 0,125% Methansäure

4 Methoden

(Ameisensäure) mit einer Geschwindigkeit von 280 nL/min entwickelt wurde. Die sich anschließende Massenspektrometrie wurde mit folgenden Parametern durchgeführt, wobei jede Probe als technisches Duplikat gemessen wurde:

| | |
|--------------------------------|-------------------------|
| <i>MS RunTime</i> | <i>96 or 156 min</i> |
| <i>MSI Scan Range</i> | <i>300 – 1500</i> |
| <i>Top 20 MS/MS:</i> | |
| <i>Min Signal</i> | <i>500</i> |
| <i>Isolation Width</i> | <i>2.0</i> |
| <i>Normalized Coll. Energy</i> | <i>35.0</i> |
| <i>Activation-Q</i> | <i>0.250</i> |
| <i>Activation Time</i> | <i>20.0</i> |
| <i>Lock Mass</i> | <i>371.101237</i> |
| <i>Charge State Rejection</i> | <i>Enabled</i> |
| <i>Charge State 1+</i> | <i>Rejected</i> |
| <i>Dynamic Exclusion</i> | <i>Enabled</i> |
| <i>Repeat Count</i> | <i>1</i> |
| <i>Repeat Duration</i> | <i>35.0</i> |
| <i>Exclusion List Size</i> | <i>500</i> |
| <i>Exclusion Duration</i> | <i>40.0</i> |
| <i>Exclusion Mass Width</i> | <i>Relative to Mass</i> |
| <i>Exclusion Mass Width</i> | <i>10ppm</i> |

Danach wurden MS/MS Spektren mit Hilfe der Software SEQUEST evaluiert. Für die Peptidentifizierung wurde die aktuellste NCBI Datenbank für *Homo sapiens* und Coronaviren verwendet (stand 04.05.2015). Die Massengenauigkeit wurde auf +/-50 ppm für Vorläufer-Ionen und auf 1 Da für Produkt-Ionen festgesetzt. Die Ergebnisse wurden mit einer Massengenauigkeit von +/- 5 ppm für Vorläufer-Ionen und der Anwesenheit des vermuteten Motifs gefiltert.

Die auf diese Weise erhobenen Daten wurden an das Rudolf-Buchheim Institut für Pharmakologie übergeben und für die weitere bioinformatische Analyse verwendet.

4.4 Arbeiten mit Viren

In dieser Arbeit wurde ausschließlich das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E *gene bank accession no.* AF304460) verwendet, welches von Prof. Dr. John Ziebuhr zur Verfügung gestellt wurde (AG Ziebuhr, Universität Gießen). Infizierte Zellen wurden generell bei 33°C kultiviert, da dies die optimale Bedingung für deren Replikation darstellt.

4.4.1 TCID₅₀ assay

Für Infektionsexperimente wurden die Zellen in der Regel mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1 infiziert, was bedeutet, dass für jede Zelle ein infektiöses Partikel hinzugegeben wurde. Um zu determinieren, wie viele infektiöse Partikel in einem Virusüberstand enthalten sind, wurden *tissue culture infectious dose 50%* (TCID₅₀) *assays*, die eine Endpunkt Verdünnungsanalyse darstellen, durchgeführt. Mit Hilfe des TCID₅₀ *assay* kann der Infektionstiters jedes Virus bestimmt werden, welches zytopathische Effekte im Zellkultursystem in einem vertretbaren Rahmen von 5 – 20 Tagen auslöst. Dies gilt außerdem nur, wenn die Zellen der Kontrollbedingungen über diesen Zeitraum am Leben bleiben. Für den *assay* werden die zu untersuchenden Virusproben seriell verdünnt und anschließend auf die Zellen gegeben, die wiederum für einen determinierten Zeitraum kultiviert werden. Durch die Verdünnung kann anschließend eine Inaktivierungskurve errechnet werden, bei welcher der 50% Inaktivierungswert abgelesen wird. In den durchgeführten Experimenten kann davon ausgegangen werden, dass 3 TCID₅₀ einer MOI von 1 entsprechen (LaBarre and Lowy 2001).

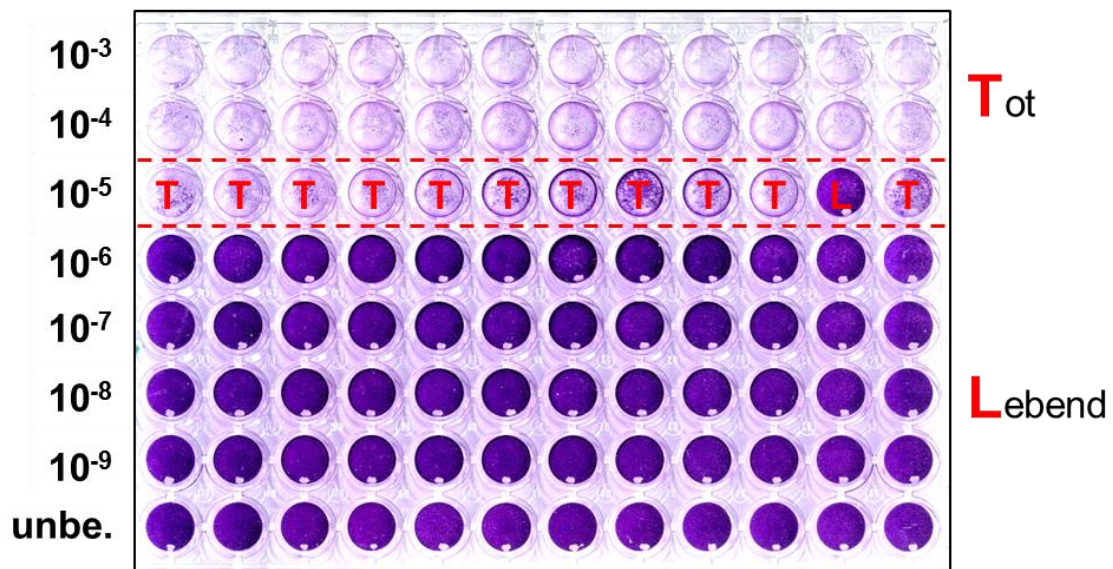
Für die hier durchgeführten TCID₅₀ *assays* wurden 96-Loch Zellkulturplatten verwendet. In jedes Gefäß der Platte wurden 1×10^4 HuH7 Zellen in einem Volumen von 100 µl gesät. Am nächsten Tag wurde die serielle Verdünnung des zu bestimmenden Virusüberstandes durchgeführt. Die Probe wurde zunächst auf Eis aufgetaut. Dann wurden 200 µl entnommen und in 1,8 ml kaltes DMEM gegeben (Verdünnung 10^{-1}). Dieser Schritt wurde bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} wiederholt. Anschließend wurden von den Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-9} , sowie einer DMEM Kontrolle jeweils 100 µl in 12 Löcher der 96-Loch Platte gegeben. Die Platte wurde anschließend für 6 Tage bei 33°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und jedes Loch mit 35 µl in 20% Ethanol gelöstem Kristallviolett (0,1% (w/v)) versetzt. Nach einer Inkubation von mindestens einer Minute wurde die Kristallviolettlösung ausgeklopft, um danach aufgrund der Färbung die Vitalität der Zellen zu bewerten. Nur lebende Zellen können mit Kristallviolett gefärbt werden. Anschließend wurde aufgrund des Verhältnisses von toten zu lebenden Zellen der TCID₅₀ bestimmt (nach Reed und Muench 1926)(Ramakrishnan 2016). Dies wird im Folgenden anhand eines Beispiels dargestellt

(Abbildung 6). Um die 50% Endpunktverdünnung ($TCID_{50}$) zu berechnen, werden zunächst die Mortalitäten über und unter 50% berechnet und in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{\text{Mortalität über 50\%} - 50}{\text{Mortalität über 50\%} - \text{Mortalität unter 50\%}} = \frac{91,67 - 50}{91,67 - 0} = 0,45$$

Die Summe des oben ermittelten Wertes und des negativen dekadischen Logarithmus der letzten Verdünnung mit einer Mortalität von über 50% (in diesem Fall 10^{-5}), wird als Exponent zur Basis 10 verwendet (also $10^{5,45}$). Dieser Wert entspricht dem $TCID_{50}$ bezogen auf 100 μ l eingesetzte virushaltige Verdünnungen und wird daher mit 10 multipliziert, um den $TCID_{50}/\text{ml}$ zu berechnen (also $10^{6,45}$ oder $2,8 \times 10^6$ $TCID_{50}/\text{ml}$ in Abbildung 6).

Verdünnung



| virushaltige Probenverdünnung | tot „T“ | lebend „L“ | Mortalität (%) |
|----------------------------------|------------|---------------|-------------------|
| 10^{-3} | 12 | 0 | 100 |
| 10^{-4} | 12 | 0 | 100 |
| 10^{-5} | 11 | 1 | 91,67 |
| 10^{-6} | 0 | 12 | 0 |
| 10^{-7} | 0 | 12 | 0 |
| 10^{-8} | 0 | 12 | 0 |
| 10^{-9} | 0 | 12 | 0 |

Abbildung 6: Beispieldarstellung einer HCoV-229E Titration und der Auswertung für die $TCID_{50}/\text{ml}$ Berechnung. Dargestellt ist eine 96-Loch Platte, die mit verschiedenen Verdünnungen einer virushaltigen Probe infiziert wurde. Durch die anschließende Kristallviolett-färbung werden nur lebende Zellen gefärbt. Durch die Auszählung kann die Mortalität jeder Verdünnung bestimmt werden, sodass mit Hilfe dieser Werte der $TCID_{50}/\text{ml}$ errechnet wird.

4.4.2 Viruspropagation

Für die Herstellung des HCoV-229E wurden 1×10^7 HuH7 Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit einer niedrigen MOI von unter 0,1 infiziert und weiter bei 33°C kultiviert. Sobald zytopathische Effekte erkennbar wurden (i.d.R. nach 35 - 45 h) wurden die Überstände abgenommen und zentrifugiert (500 g bei 4°C). Anschließend wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Der Titer wurde danach über den TCID₅₀ assay bestimmt.

4.5 Bioinformatische Arbeiten

4.5.1 Auswertung des A549 Kinetik *microarrays* (GEn-1311)

Für die Auswertung wurden die \log_2 transformierten berechneten Expressionswerte (E-Werte) verwendet. Die aus A549 Zellen erhobenen Daten wurden über die NormExp Prozedur hintergrundbereinigt und quartilnormalisiert (Abbildung 8). Um exprimierte Gene herauszufiltern, wurden die Intensitätswerte der negativen Kontrollpunkte für jeden *array* determiniert. Ein Intensitätswert wurde als messbar determiniert, wenn sein Signal 3-fach über der Interquartilweite des dritten Quartils lag. Ein Gen wurde als exprimiert determiniert, wenn mindestens 50% der zugehörigen Intensitätswerte messbar waren. Außerdem wurde ein Gen als exprimiert angesehen, wenn zu mindestens einer der biologischen Bedingungen 50% der zugehörigen Intensitätswerte messbar waren. Für die Auswahl deregulierter Gene wurde, da es sich um ein Einzelexperiment handelte, ein heuristisches *noiseband* berechnet, welches das Rauschen der drei Proben die mit hitzeinaktiviertem Virusüberstand behandelt wurden widerspiegelt. Die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiv erkannten Genes liegt bei unter 0,1%. Die Funktion des *noiseband* lautet $1,5 \cdot 8/A$, wobei A das durchschnittliche \log_2 Signal repräsentiert.

4.5.2 Auswertung der A549 LMD *microarrays* (GEn-1314)

Für die Auswertung wurden die \log_2 transformierten berechneten Expressionswerte (E-Werte) verwendet. Die aus dissektierten A549 Zellen erhobenen Daten wurden über die NormExp Prozedur hintergrundbereinigt und quartilnormalisiert, wobei zunächst die Werte der beiden biologischen Replikate gemittelt wurden (Abbildung 12). Um exprimierte Gene herauszufiltern, wurden die Intensitätswerte der negativen Kontrollpunkte für jeden *array* determiniert. Ein Intensitätswert wurde als messbar determiniert, wenn

sein Signal 3-fach über der Interquartilweite des dritten Quartils lag. Ein Gen wurde als exprimiert determiniert, wenn mindestens 50% der zugehörigen Intensitätswerte messbar waren. Außerdem wurde ein Gen als exprimiert angesehen, wenn zu mindestens einer der biologischen Bedingungen 50% der zugehörigen Intensitätswerte messbar waren. Für die Auswahl deregulierter Gene wurde, um eine Vergleichbarkeit zum kinetischen *microarray* zu gewährleisten, ebenfalls ein heuristisches *noiseband* berechnet. Die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiv erkannten Genes liegt bei unter 0,1%. Die Funktion des *noiseband* lautet $1,5 \cdot 8/A$, wobei A das durchschnittliche \log_2 Signal repräsentiert.

4.5.3 Auswertung der HuH7 *microarrays* (GEn-1312, GEn-1313 und GEn-1548)

Für die Auswertung wurden die \log_2 transformierten berechneten Expressionswerte (E-Werte) verwendet. Die aus HuH7 Zellen erhobenen Daten wurden über die NormExp Prozedur hintergrundbereinigt. Um exprimierte Gene herauszufiltern, wurden die Intensitätswerte der negativen Kontrollpunkte für jeden *array* determiniert. Darüber hinaus wurden Gene von weiteren Analysen ausgeschlossen, wenn die Schwankungen innerhalb der biologischen Replikate zu groß waren. Dafür wurden sowohl die Standardabweichung, als auch der Variationskoeffizient (CV) berechnet. Für die unbehandelten Kontrollen und die Infektionsbedingung (je $n = 4$), wurde eine maximale Standardabweichung von unter 2,4 und ein maximaler CV von unter 0,5 zugelassen. Für die Proben, in denen die Zellen mit hitzeinaktiviertem Virusüberstand oder IL-1 α behandelt wurden (je $n = 2$), wurde eine maximale Standardabweichung von unter 2,4 und ein maximaler CV von unter 0,6 zugelassen. Außerdem wurden alle Gene von der weiteren Analyse ausgeschlossen, deren E-Werte nicht in jedem Experiment bestimmt werden konnten. Dies betrifft insgesamt 1227 Gene. Außerdem wurden Gene nur als exprimiert angesehen, wenn der E-Wert mindestens bei drei lag (\log_2). Demnach wurde eine Ratio zwischen zwei biologischen Bedingungen berechnet, wenn der E-Wert mindestens in einer der beiden Bedingungen über 3 lag (\log_2). Dies betrifft, bezogen auf alle 4 ermittelten Ratios, 12329 Gene nicht, sodass insgesamt 20194 Gene für weitere Analysen verwendet wurden.

4.5.4 Auswertung der markierungsfreien massenspektrometrischen Daten

Zur Filterung der im Kapitel 4.3.7 erhobenen Daten, wurde zunächst eine Mediannormalisierung durchgeführt. Anschließend wurden für die weitere Filterung Ausschlusskriterien auf Basis der berechneten Ratios und der gemessenen Intensitäten verwendet. Dafür wurden zunächst die ermittelten Ratios \log_2 transformiert. Für den Proteomdatensatz wurden die gemessenen Intensitäten mehrerer Peptide, die das gleiche Protein repräsentieren, summiert. Für alle 4 Datensätze wurden anschließend

auf Basis der gemessenen Intensitäten eine Ausschlussschwelle von 250000 (AU) gesetzt, wobei diese zu mindestens einem der untersuchten Zeitpunkte überschritten werden musste, um das Protein oder das Peptid für weitere Analysen zu verwenden. Darüber hinaus wurden Proteine und Peptide von weiteren Analysen ausgeschlossen, wenn die Schwankungen innerhalb der technischen Replikate zu groß waren. Dafür wurde der CV berechnet. Für gegenüber der Kontrolle induzierte Proteine und Peptide wurde ein maximaler CV der Infektionsbedingung von unter 0,5 zugelassen. Für Proteine und Peptide die reprimiert waren, wurde ein maximaler CV der Kontrollbedingung von unter 0,5 zugelassen. Die auf diese Weise erhobenen Datensätze wurden auf Basis der Ratio weiter gefiltert, wobei eine Ausschlussschwelle von 1-fach (\log_2) gesetzt wurde. Diese gilt allerdings nur für Proteine und Peptide, deren gemessene Intensität zu mindestens einer der beiden Bedingungen über 1000000 (AU) lag. Für Proteine deren gemessene Intensität unter diesem Wert lag, wurde die Ausschlussschwelle auf 1,32-fach (\log_2) erhöht (entspricht retransformiert 2,5-fach).

4.5.5 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) und Gene Ontology (GO) Analysen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Anreicherungsanalysen für KEGG Signalwege und GO Kategorien wurde das *onlinetool* „WebGestalt“ verwendet (Zhang, Kirov et al. 2005). Für *overrepresentation analysis* (ORA) Ansätze wurden die vorgegebenen Standardbedingungen benutzt, sodass nur eine Anreicherung für Signalwege und Kategorien mit mindestens 5 und höchstens 2000 hinterlegten Referenzgenen verwendet wurden. Außerdem wurde eine Benjamini Hochberg korrigierte *false discovery rate* (FDR) von höchstens 0,05 vorausgesetzt. Desweiteren wurde als Referenz das gesamte Genom verwendet. Für *genes set enrichment analysis* (GSEA) wurden die gleichen Kriterien verwendet, wobei 1000 Permutationen durchgeführt wurden. Da WebGestalt bei GSEA eine FDR unter 0,001 als 0 angibt, wurden für die Erzeugung von *bubbleplots* jede FDR von 0 als 0,001 definiert (Abbildung 18 und Abbildung 19). Die Auswahl der am stärksten angereicherten Signalwege/Kategorien erfolgte über die Filterung der höchsten beziehungsweise niedrigsten *normalized enrichment scores* (NES). Bei ORA wurden die Signalwege/ Kategorien dargestellt, die die höchste Ratio von deregulierten Genen zu statistisch erwarteten deregulierten Genen aufwiesen (*ratio of enrichment*). Die Größe der *bubbles* wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\sqrt{\text{Gesamtanzahl Gene (Signalweg/Kategorie)} * 2}}{\pi}$$

4.6 Mikrobiologische Arbeiten

4.6.1 Chemische Transformation

Für die Transformation wurden 1 - 5 µl der Klonierungsreaktion oder 50 ng Plasmid zu den chemisch-kompetenten Bakterien gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 30 s bei 42°C ausgesetzt. Danach wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gestellt und zu diesem wurden 500 µl auf Raumtemperatur vorgewärmtes LB-Medium gegeben. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 600 rpm und 37°C für 1 h geschüttelt. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf vorgewärmte LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6.2 Herstellung von Bakteriellen Dauerkulturen

Die dauerhafte Aufbewahrung von Bakterien erfolgte bei -80°C in Glycerin. Zur Herstellung der Glycerindauerkulturen wurde 800 µl Bakteriensuspension mit 800 µl Glycerin gemischt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.6.3 Herstellung von transformationskompetenten Bakterien (chemisch)

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden am Nachmittag 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Anschließend wurde das Medium mit *E.coli XL1-Blue* oder *E.coli TOP10* angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen 100 ml LB-Medium so beimpft, dass die optische Dichte 0,06 betrug. Diese Bakteriensuspension wurde dann so lange bei 37°C und 180 rpm inkubiert bis sie eine optische Dichte von 0,6 erreicht hatte. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000 rpm und 4°C 10 min lang abzentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in 1/10 Zellvolumen TSS-Puffer (*transformation and storage solution*) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde sofort auf Eis gegeben und à 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.7 PCR basierte Methoden

4.7.1 Microarrays

Die aufgereinigte gesamt RNA aus A549 und HuH7 Zellen wurde unter Verwendung des *LIRAK Kits* der Firma *Agilent* Cy3 markiert und amplifiziert. Pro Reaktion wurden 200 ng gesamt RNA verwendet. Die Cy3 markierte amplifizierte *antisense* RNA (aRNA) wurde anschließend über Nacht auf 8x60K mit 60 mer Oligonukleotiden versehene *microarray* Objektträger hybridisiert (*Agilent Technologies, design ID 039494*). Dabei wurden alle Schritte entsprechend den Herstellerangaben eingehalten. Die getrockneten Objektträger wurden mit einer Auflösung von 2 µm/Pixel unter Verwendung eines *InnoScan is900* (*Innopsys, Carbonne, France*) gescannt. Für die Folgende Bildanalyse wurde die *Mapix 6.5.0 Software* verwendet. Die Ergebnisse wurden anschließend unter Verwendung der *software R* mit dem *limma Paket* (*BioConductor*) evaluiert. Die *microarrays* wurden vollständig von Jochen Wilhelm durchgeführt (Deutsches Zentrum für Krebsforschung, Universität Gießen)

4.7.2 Mutagenese PCR

Die Herstellung von Punkt- oder Deletionsmutanten erfolgte nach dem *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* Protokoll der Firma *Stratagen*. Zur Herstellung der Deletionsmutanten wurde dieses leicht abgewandelt. Bei diesem Verfahren wird die Punktmutation bzw. Deletion durch Primer, welche die Mutation enthalten oder welche aus Sequenzen aufgebaut sind, die den zu deletierenden Bereich flankieren, in einer PCR direkt in das in einem Vektor befindliche Gen eingefügt. Anschließend wird die methylierte Matrizen-DNA (DNA aus Bakterien wird in den meisten Stämmen methyliert) selektiv durch einen DpnI-Verdau aus dem Reaktionsansatz entfernt, während die neu synthetisierte unmethylierte DNA, welche die Mutation enthält, für die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien verwendet wird. Die neu synthetisierten Plasmide enthalten dabei 2 Einzelstrangbrüche, die nach der Inkorporation der Plasmide in den Bakterien repariert werden.

Folgender Ansatz wurde für eine Punktmutagenese-PCR Reaktion pipettiert, wobei auch zwei Primerpaare gleichzeitig verwendet werden können:

| | |
|---|--------|
| Template | 50 ng |
| 10x PCR-Puffer (enthält 20 mM MgSO ₄) | 5 µl |
| Primer <i>sense</i> | 125 ng |

4 Methoden

| | |
|-------------------------|----------------------|
| Primer <i>antisense</i> | 125 ng |
| dNTP-Mix | 0,2 mM pro Nukleotid |
| ddH ₂ O | ad. 50 µl |
| Pfu-Polymerase | 1 µl (2,5 U) |

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

| | Temperatur (°C) | Zeit (min) | Zyklen |
|------------------|-----------------|--------------------|--------|
| Denaturierung | 95 | 0,5 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 0,5 | 18 |
| <i>Annealing</i> | 55 | 1 | 18 |
| Elongation | 68 | 1 min / kb Plasmid | 18 |

Für eine Deletion wurde eine Präamplifikation in zwei separaten Reaktionsgefäßen durchgeführt:

| | |
|---|----------------------|
| Template | 100 ng |
| 10x PCR-Puffer (enthält 20 mM MgSO ₄) | 5 µl |
| Primer <i>sense</i> oder <i>antisense</i> | 125 ng |
| dNTP-Mix | 0,2 mM pro Nukleotid |
| ddH ₂ O | ad. 50 µl |
| Pfu-Polymerase | 0,5 µl (1,25 U) |

Folgendes PCR-Programm wurde für die Präamplifikation verwendet:

| | Temperatur (°C) | Zeit (min) | Zyklen |
|------------------|-----------------|--------------------|--------|
| Denaturierung | 95 | 0,5 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 0,5 | 10 |
| <i>Annealing</i> | 55 | 1 | 10 |
| Elongation | 68 | 1 min / kb Plasmid | 10 |

Anschließend wurden je 25 µl beider Ansätze vereinigt und nochmals mit 0,5 µl Pfu-Polymerase versetzt. Es folgte die eigentliche PCR-Reaktion, die der für die Einführung von Punktmutationen entspricht.

Die Schmelztemperatur der vollständigen Deletionsprimer sowie der Punktmutationsprimer betrug in der Regel $\geq 78^{\circ}\text{C}$. Die Berechnung der Schmelztemperatur der Punktmutationsprimer erfolgt mit der Formel: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{GC}) - 675 / N - \% \text{mismatch}$

Hierbei stellt N die Primerlänge dar. Diese lag zwischen 25 und 45 Basenpaaren und der Primer enthielt die gewünschte Mutation relativ in der Mitte der Sequenz. Für Deletionen wurden Primer mit einer Länge von 45 Basenpaaren gewählt. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer einen minimalen GC-Gehalt von 40% aufwiesen und an ihren Enden eine oder mehrere G-oder C-Basen enthielten.

4.7.3 Reverse Transkription (RT)

Bei einer RT wird die RNA durch Reverse Transkriptasen oder RNA-abhängige DNA-Polymerasen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Reverse Transkription von gesamt RNA Extrakten erfolgte durch die *MMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus)* Reverse Transkriptase der Firma *Applied Biosystems* oder *RevertAid Reverse Transkriptase* der Firma *Thermo Scientific*.

Ein 20 µl RT-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|-----------------------|-------------|
| RNA | bis zu 1 µg |
| 5x RT-Puffer | 1 µl |
| Random Hexamer Primer | 0,5 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | ad. 19,5 µl |
| reverse Transkriptase | 0,5 µl |

Folgende Temperaturprogramme wurden für die reverse Transkription verwendet:

| <i>MMLV reverse Transkriptase</i> | | <i>RevertAid reverse Transkriptase</i> | |
|-----------------------------------|------------|--|------------|
| Temperatur (°C) | Zeit (min) | Temperatur (°C) | Zeit (min) |
| 23 | 10 | 25 | 10 |
| 37 | 60 | 42 | 60 |
| 95 | 5 | 70 | 10 |
| 4 | ∞ | 4 | ∞ |

Die Proben wurden direkt für eine *real time* PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.7.4 Real time PCR (*TaqMan* basiert)

Die *real time* PCR ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Die Firma *Applied Biosystems* bietet für die Detektion und akkurate Quantifizierung von mRNAs vorgefertigte und validierte Anwendungen an (*TaqMan Assays on Demand*). Hierbei erfolgt die Quantifizierung der PCR-Produkte über die Verwendung von *TaqMan*-Sonden, die neben herkömmlichen PCR-Reagenzien in die Reaktion eingesetzt werden. Die Sonde ist am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM (Fluorencin) und am 3'-Ende mit dem nicht fluoreszierenden Quencher TAMRA (Tetramethylrhodamine) versehen. Während der PCR bindet die Sonde spezifisch an eine komplementäre Sequenz des Matrizenstranges, welche zwischen den Primerbindungsstellen lokalisiert ist. In diesem Zustand wird aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher, die Fluoreszenz des Reporters aufgrund von FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Trifft die DNA-Polymerase während der Synthese des komplementären DNA-Stranges auf die Sonde wird diese verdrängt, wodurch sich eine Y-förmige Sekundärstruktur ausbildet. Diese aktiviert die 5'-3'-Exonuklease der DNA-Polymerase und führt zur Degradation der Sonde. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher zerstört und ein FRET kann nicht länger stattfinden. Der Zyklenzahl entsprechenden zunehmenden Amplifikation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem zusätzlichen Zyklus an. Für die Auswertung wurde eine relative Quantifizierung verwendet, indem ein Referenzgen parallel gemessen und verrechnet wird ($\Delta\Delta C_T$ -Methode). Der ermittelte C_T -Wert (*Cycle Threshold*) beschreibt den Zyklus der PCR, in dem das Signal signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Für eine Normalisierung werden die C_T -Werte von Zielgen und nicht-reguliertem Referenzgen voneinander subtrahiert (ΔC_T). Anschließend erfolgt die Berechnung der differentiellen Expression durch die Differenz zweier ΔC_T -Werte ($\Delta\Delta C_T$). Die unterschiedliche Expression wird dann als x-fache Expression mit $n = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ angegeben.

In dieser Arbeit wurde das Referenzgen hGUSB zur Normalisierung verwendet und die infizierten/stimulierten Proben auf die unbehandelten Kontrollen bezogen, wobei alle Proben als technische Duplikate unter Verwendung eines *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systemes*, gemessen wurden.

Ein 20 μ l *real time* PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|--|-------------|
| <i>TaqMan FAST 2x Universal Master Mix</i> | 10 μ l |
| RT-Probe | 2 μ l |
| <i>TaqMan Assay on Demand</i> Sonde | 0,5 μ l |
| ddH ₂ O | 7 μ l |

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

| | Temperatur (°C) | Zeit (sec) | Zyklen |
|------------------------------|-----------------|------------|--------|
| Polymeraseaktivierung | 95 | 20 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 3 | 40 |
| <i>Annealing</i> /Elongation | 60 | 30 | 40 |

4.7.5 Real time PCR (SYBR green basiert)

Zur Analyse von viraler RNA und von mRNA wurde außerdem ein *SYBR green* basiertes System verwendet. Der Cynin-Fluoreszenzfarbstoff bindet an doppelsträngige DNA. Auch hier korreliert die Zunahme des Fluoreszenzsignals mit dem Anstieg der PCR-Produkte. Der Farbstoff differenziert jedoch nicht zwischen spezifischem PCR-Produkt und eventuell auftretenden Nebenprodukten oder Primer-Dimeren. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse wurde am Ende der PCR die Spezifität der verwendeten Primer überprüft. Durch einen kontinuierlichen Temperaturanstieg wird dabei der DNA-Doppelstrang bei seiner spezifischen Schmelztemperatur aufgeschmolzen. Der Farbstoff wird freigesetzt und eine Änderung des Fluoreszenzsignals registriert. Eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde dann wie in 4.7.4 beschrieben über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode vorgenommen, wenn die Schmelzkurvenanalyse eindeutig ein einzelnes PCR-Produkt ergab.

Ein 20 µl *real time* PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|--|--------|
| <i>FAST SYBR green 2x PCR Master Mix</i> | 10 µl |
| RT-Probe | 2 µl |
| Primer <i>sense</i> | 0,5 µl |
| Primer <i>antisense</i> | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | 7,5 µl |

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

| | Temperatur (°C) | Zeit (sec) | Zyklen |
|------------------------------|-----------------|------------|--------|
| Polymeraseaktivierung | 95 | 20 | 1 |
| Denaturierung | 95 | 3 | 40 |
| <i>Annealing</i> /Elongation | 60 | 30 | 40 |

4.7.6 Real time PCR (*PreAmp Cells to C_T Kit*)

Da aus Lasermikrodissektierten Zellen nur sehr geringe Menge an RNA isoliert werden können, wurde für die Anreicherung der Signale das *PreAmp Cells-to-C_T-Kit* der Firma *Advanced Biotechnologies* (ABI) verwendet. Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA Proben über das *RNA 6000 Pico® Kit* von *Agilent Technologies* wurden 400 pg in die RT-Reaktion eingesetzt, die sich wie folgt zusammensetzte:

| | |
|--------------------|-----------|
| RNA-Probe | 400 pg |
| RT-Puffer 2x | 5 µl |
| RT-Enzym Mix 20x | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | ad. 10 µl |

Folgendes Temperaturprogramm wurde für die reverse Transkription verwendet:

| Temperatur (°C) | Zeit (min) |
|-----------------|------------|
| 37 | 60 |
| 95 | 5 |
| 4 | ∞ |

Im nächsten Schritt wurde die gewonnene cDNA mit genspezifischen Primern oder *TaqMan Assay-On-Demand* Sonden preamplifiziert. Dazu wurden die Primer und Sonden 1:100 in TE-Puffer verdünnt. Für die Preamplifikation wurden folgende Primerpaare / Sonden verwendet:

Primerpaare: HCoV-229E *genomic RNA1(NSP8)*, *AKTB*

Sonden: *GUSβ*, *IL8*, *IL6*, *HERPUD1*, *ATF3*, *EGR1*, *DUSP1*, *TNFAIP3*, *ZC3H12A*, *DDIT3*, *DNAJB9*

Der 10 µl Preamplifikationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|---------------------------------------|--------|
| cDNA Probe (aus RT) | 2,5 µl |
| <i>gepoolte</i> Primer/Sonden (1:100) | 2,5 µl |
| <i>TaqMan PreAmp Mastermix</i> 2x | 5 µl |

Folgendes PCR-Programm wurde für die Preamplifikation verwendet:

| | Temperatur (°C) | Zeit (min) | Zyklen |
|-----------------------|-----------------|------------|--------|
| Polymeraseaktivierung | 95 | 10 | 1 |

4 Methoden

| | | | |
|----------------------|----|------|----|
| Denaturierung | 95 | 0,25 | 15 |
| Annealing/Elongation | 60 | 4 | 15 |

Die Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert, oder direkt für eine *real time* PCR verwendet, wofür der preamplifizierte RT-Ansatz 1:5 in TE-Puffer verdünnt wurde.

Der 20 µl *real time* PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|--|-------|
| <i>TaqMan FAST 2x Universal Master Mix</i> | 10 µl |
| Preamplifizierte Probe | 4 µl |
| <i>TaqMan Assay on Demand</i> Sonde | 1 µl |
| ddH ₂ O | 5 µl |

oder

| | |
|--|-------|
| <i>FAST SYBR green 2x PCR Master Mix</i> | 10 µl |
| Preamplifizierte Probe | 4 µl |
| Primer <i>sense</i> | 1 µl |
| Primer <i>antisense</i> | 1 µl |
| ddH ₂ O | 4 µl |

Die Proben wurden als Doppelwerte in 96-Well Platten pipettiert. Die Analyse erfolgte mittels *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System* nach dem Temperaturprofil der *real time* PCR (Kapitel 4.7.4 und 4.7.5).

4.8 Zellbiologische Arbeiten

4.8.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine und damit Strukturen in der Zelle mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht werden. Die Zellen werden hierfür zunächst mit einem primären gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper inkubiert. Dieser wird dann durch einen Sekundärantikörper, welcher mit einem Fluorochrom versehen ist und Speziesimmunglobulinspezifität für den Primärantikörper besitzt, erkannt. In dieser Arbeit wurden Cy3-, Cy5- und Dylight488 gekoppelt Sekundärantikörper verwendet. Um die Antikörper aufzunehmen, muss die Membran der

Zellen permeabilisiert werden, daher kann nur mit fixierten Zellen gearbeitet werden. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen in μ -Slides VI ausgesät. Dazu wurden zwischen 8000 und 20000 Zellen in einem Volumen von 30 μ l ausgesät. Nach 1 h in Kultur, wurden 100 μ l Medium hinzugefügt. 24 h später wurde Stimulationen oder Infektionen durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit je 150 μ l HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 100 μ l 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal für je 5 min mit jeweils 150 μ l HBSS gewaschen und dann in 100 μ l 10% Serum geblockt. Das Serum stammte nach Möglichkeit aus dem Tier, indem auch der Sekundärantikörper generiert wurde. Die Verdünnung des Serums erfolgte in HBSS, welches zusätzlich 0,1% Saponin enthielt. Dieses diente zur Permeabilisierung der Zellen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 100 μ l Primärantikörperlösung für 2 h bei Raumtemperatur. Der Antikörper wurde hierbei 1:50 - 1:200 in HBSS/0,1% Saponin verdünnt. Vor der Inkubation mit 100 μ l Sekundärantikörperlösung für weitere 2 h, wurden die Zellen dreimal für je 10 min mit jeweils 150 μ l HBSS/0,1% Saponin gewaschen. Der Cy3 gekoppelte Antikörper wurden in einer Konzentration von 1,25 μ g/ml eingesetzt, während der Dylight 488 gekoppelte Antikörper in einer Konzentration von 5 μ g/ml verwendet wurden. Der Cy5 gekoppelte Antikörper wurde in einer Konzentration von 6,7 μ g/ml eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte wie beim Primärantikörper in HBSS/0,1% Saponin. Die Zellen wurden anschließend dreimal für 10 min mit jeweils 150 μ l Hanks Puffer gewaschen und dann einer Hoechst-Färbung unterzogen. Hierfür wurden die Zellen für 5 min in 100 μ l einer 1 μ M Hoechst-Lösung (Verdünnung in HBSS) inkubiert. Hoechst 33342 (Bisbenzimid) interkaliert dabei zwischen Basen der DNA. Die Zellen wurden dann innerhalb von 5 min zweimal mit HBSS gewaschen und für die Mikroskopie mit 50 μ l einer 30% (v/v) Glycerollösung versetzt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte zeitnah (maximal 48 Stunden später). Die mikroskopischen Aufnahmen der Fluoreszenzbilder erfolgten mit den Mikroskopen DMIRE2 und DMi8 von *Leica* und den entsprechenden Computerprogrammen (FW4000 bzw. LasX der Firma *Leica*).

4.8.2 Verkürzte indirekte Immunfluoreszenzfärbung für Lasermikrodissektion

Für die verkürzte indirekte Immunfluoreszenz wurden 350000 A549 Zellen in *WillCo-dishes* (FWST-5030-2 PEN) ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit einer MOI von 1 infiziert. Nach der Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 2 ml Methanol fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen einmal für 30 s mit 2 ml HBSS gewaschen und dann mit 2 ml 10% Serum für 3 min blockiert. Das Serum stammte immer aus dem Tier, indem auch der Sekundärantikörper generiert wurde. Die Verdünnung des Serums erfolgte in HBSS, welches zusätzlich 0,1% Saponin enthielt. Dieses diente zur Permeabilisierung der Zellen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 400 μ l Primärantikörperlösung

4 Methoden

für 5 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Dabei war darauf zu achten, dass die Antikörperlösung möglichst nur die Membran bedeckt. Der Antikörper wurde hierbei 1:50 (N-Protein) und 1:400 (PolymeraseII Phosphoserin 2) in HBSS/0,1% Saponin verdünnt. Vor der Inkubation mit 400 µl Sekundärantikörperlösung für weitere 5 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, wurden die Zellen einmal für 30 s mit 2 ml HBSS/0,1% Saponin gewaschen. Die Cy3-gekoppelten Antikörper (für N Protein) wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt, während die Dylight 488 gekoppelte Antikörper in einer Konzentration von 2,5 µg/ml verwendet wurden. Die Verdünnung erfolgte wie beim Primärantikörper in HBSS/0,1% Saponin. Die Zellen wurden anschließend dreimal für 30 s mit jeweils 2 ml HBSS und ein weiteres Mal mit ddH₂O gewaschen. Die Zellen wurden anschließend bei 40°C für 30 min luftgetrocknet. Die Lasermikrodissektion erfolgte sofort im Anschluss mit dem *LMD6000* System der Firma *Leica*. Dissektierte Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Während der gesamten Prozedur wurde so RNase frei wie möglich gearbeitet.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort auf der Ebene des Transkriptoms

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirtsantwort auf eine HCoV-229E Infektion auf verschiedenen Regulationsebenen analysiert werden. Dafür wurden zu Beginn *microarray* Studien in den Zelllinien A549 und HuH7 durchgeführt.

5.1.1 Initiale Analyse der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort in humanen epithelialen alveolären adenokarzinomzellen (A549)

Analysen der humanpathogenen MERS- und SARS-Coronaviren zeigten, dass infiziertes Lungengewebe in Primaten und Mäusen eine starke proinflammatorische Wirtszellantwort aufweist (Smits, de Lang et al. 2010; Coleman, Sisk et al. 2017). Um zu validieren, ob dies auch im Zellkultursystem für das HCoV-229E der Fall ist, wurden A549 Zellen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1 infiziert. Die Zellen wurden bis zu 48 Stunden in Kultur gehalten, um anschließend die Genexpressionsänderungen von *Interleukin 6* (*IL6*) und *Interleukin 8* (*IL8*) zu messen. Als Kontrollen dienten für jeden Zeitpunkt Zellen, die mit der gleichen Menge von hitzeinaktiviertem Virusüberstand behandelt wurden. Es zeigte sich, dass 3- bis 4-fache Induktionen der Genexpressionen von *IL6* und *IL8* frühestens nach 48 Stunden detektiert werden können (Abbildung 7 linke Seite). Gleichzeitig konnte die virale Transkription anhand zweier Primerpaare validiert werden, wobei mit dem erste Primerpaar eine Bereich im viralen Genom amplifiziert wird, der NSP8 kodiert (*RNA1*) und mit dem zweite Primerpaar ein Bereich im viralen Genom amplifiziert wird, der das S Protein kodiert (*RNA2*) (Abbildung 7 rechte Seite).

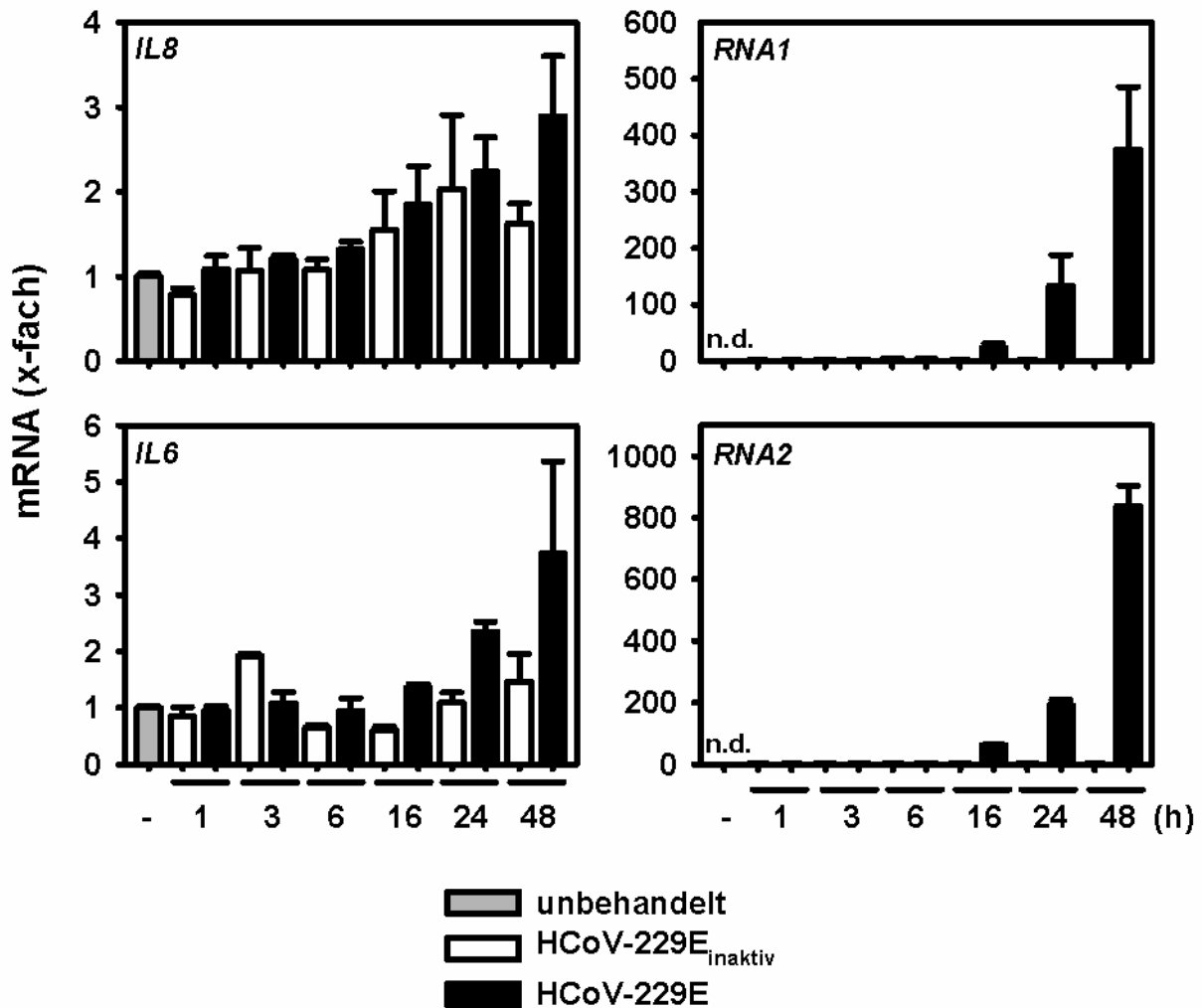


Abbildung 7: Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die *IL8* und *IL6* Genexpression in A549 Zellen mit Validierung der viralen Transkription. Die Zellen wurden nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 1, 3, 6, 16, 24 und 48 h in Kultur gehalten, oder für die gleichen Zeitspannen mit einem hitzeinaktiviertem Virusüberstand inkubiert, oder nicht behandelt. Die mRNA Expressionen von *IL8* und *IL6*, sowie der viralen RNA Abschnitte, die für *NSP8* (*RNA1*) und das S Protein (*RNA2*) kodieren, wurde mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle (*IL8* und *IL6*), oder zum ersten Infektionszeitpunkt (*RNA1* und *RNA2*). n.d. = nicht detektierbar (Poppe, Wittig et al. 2017)

Da die initiale Untersuchung der Interleukinexpressionsänderungen zeigte, dass es zu keiner soliden Induktion der Expression von *IL6* und *IL8* kommt, wurde eine *microarray* Studie durchgeführt, um festzustellen, ob es andere Gene gibt, deren Expression sich in Folge der Infektion ändern. Dafür wurden A549 Zellen für 16, 24 und 48 Stunden mit HCoV-229E (MOI = 1) infiziert. Außerdem wurden erneut Zellen zur Kontrolle für die gleichen Zeiträume mit hitzeinaktivierten Virusüberständen behandelt. Zusätzlich wurden unbehandelte und für 3 h mit IL-1 α stimulierte Zellen untersucht, um die HCoV-229E induzierten Gene mit einem starken proinflammatorischen Stimulus vergleichen zu können. Da es sich um ein Einzelexperiment handelt, wurden deregulierte Gene nicht über einen

Schwellenwert, sondern über ein *noise band* definiert, was die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse verringert. Es zeigte sich, dass gegenüber unbehandelten Zellen nach 16 Stunden 108 Gene, nach 24 Stunden 114 Gene und nach 48 Stunden 239 Gene messbar dereguliert waren.

Vergleicht man allerdings die Daten der Infektionszeitpunkte mit den zugehörigen Kontrollen, in denen hitzeinaktivierte Virusüberstände verwendet wurden, sinkt die Anzahl dereguliert gemessener Gene auf 3, 5 und 37 für die Zeitpunkte 16, 24 und 48 Stunden. Demgegenüber konnten 490 Gene determiniert werden, die durch eine dreistündige IL-1a Behandlung dereguliert werden (Abbildung 8).

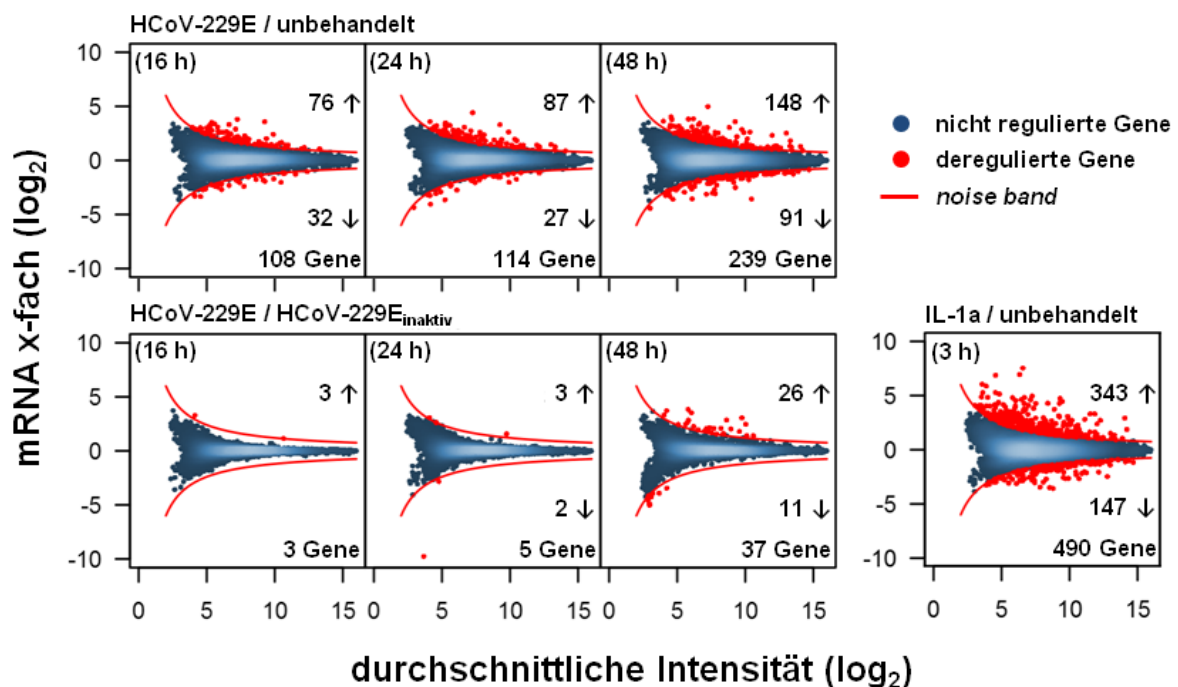


Abbildung 8: Microarray Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten Wirtsgenen in A549 Zellen im Vergleich mit IL-1a stimulierten Zellen. Die Zellen wurden nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 16, 24 oder 48 h in Kultur gehalten oder für die gleichen Zeitspannen mit einem hitzeinaktiviertem Virusüberstand inkubiert. Außerdem wurden Zellen nicht behandelt, oder für 3 h mit IL-1a stimuliert (10ng/ml). Nach der Zellernte wurden die Transkriptomdaten mit Hilfe von Agilent® microarrays ermittelt. Die Ergebnisse wurden als MA Plots visualisiert, bei welchen die \log_2 transformierten Änderungen der Genexpressionen gegen die \log_2 transformierten gemittelten Abundanzen der Gene geplottet werden. Zur Ermittlung differenziell deregulierter Gene, wurde auf Basis der gemessenen Intensitäten ein „noise band“ für alle untersuchten Vergleiche berechnet. Die außerhalb des jeweiligen „noise band“ liegenden rot markierten Wirtsgene sind dementsprechend HCoV-229E oder IL-1a abhängig dereguliert. (Poppe, Wittig et al. 2017)

Dass die Anzahl deregulierter Gene im Vergleich zu den Kontrollen, in denen die Zellen mit hitzeinaktiviertem Virusüberstand behandelt wurden derart absinkt, ist ein Indiz dafür, dass die Zellen stark auf im Virusüberstand enthaltenen lösliche Faktoren oder virale Partikel reagieren.

Dementsprechend fokussierte sich die weitere Analyse auf die 37 deregulierten Gene, die nach einer 48 stündigen Infektion als dereguliert nachgewiesen wurden. Zu diesen zählen Transkriptionsfaktoren (*early growth response 1* (EGR1), *DNA damage inducible transcript 3* (DDIT3), *activating transcription factor 3* (ATF3), *kruppel like factor 6* (KLF6), *zinc finger protein 165* (ZNF165), *basic helix-loop-helix family member e41* (BHLHE41), *zinc finger and BTB domain containing 43* (ZBTB43)), Zytokine und Proteine relevant für Stresssignalwege (*IL6*, *growth arrest and DNA damage inducible alpha* (GADD45A), *TNF α induced protein 3* (TNFAIP3)), Phosphatasen (*dual specificity phosphatase 1* (DUSP1)), sowie relevante Faktoren für den ER Stress Signalweg (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9* (DNAJB9), *neuralized E3 ubiquitin protein ligase 3* (NEURL3), *homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1* (HERPUD1), *heat shock protein family A (Hsp70) member 5* (HSPA5)) und Translationsregulatoren (*protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A* (PPP1R15A), *heat shock protein family A (Hsp70) member 1A* und *1B* (HSPA1A und HSPA1B))(siehe Abbildung 13 für eine vollständige Auflistung mit den zugehörigen Expressionsänderungen). Um festzustellen, ob diese Gene in einem funktionellen Zusammenhang stehen, wurde eine *overrepresentation analysis* (ORA) für die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) und *Gene Ontology* (GO) Datenbanken durchgeführt. Dadurch konnte eine Anreicherung für sechs KEGG Signalwege nachgewiesen werden. Beim größten angereicherten Signalweg handelte es sich um hsa04010 (*MAPK signaling Pathway*), der die klassischen proinflammatorischen Signalkaskaden umfasst, wie den JNK und den p38 Signalweg. Darüber hinaus offenbarte die Analyse eine Anreicherung für den KEGG Signalweg hsa04141 (*protein processing in endoplasmic reticulum*). Für die zwei GO Klassen *cellular component* und *molecular function* wurden keine angereicherten Kategorien gefunden. Hingegen konnte für die GO Klasse *biological process* 125 angereicherte Kategorien gefunden werden. Bei den 10 am stärksten angereicherten Kategorien handelte es sich um sehr kleine spezifische, die am unteren Ende der GO Hierarchie stehen, wobei es sich größtenteils um Kategorien handelte, die in direktem Zusammenhang mit den drei Achsen des ER Stress Signalweges stehen (*PERK-mediated unfolded protein response* GO:0036499; *ATF6-mediated unfolded protein response* GO:0036500; *regulation of IRE1-mediated unfolded protein response* GO:1903894). Die Anreicherungsanalyse für GO *biological process* wurde außerdem mit einer weniger redundanten Datenbank wiederholt, um einen globaleren Eindruck über die deregulierten Prozesse zu gewinnen. Auf diese Weise wurden 22 mit deregulierten Genen angereicherte Kategorien gefunden. Dadurch bestätigte sich die Anreicherung für die Kategorie *response to endoplasmic reticulum stress* (GO:0034976), aber es zeigte sich auch eine Anreicherung für die Kategorie *regulation of response to cytokine stimulus* (GO:0060759), was die Ergebnisse der KEGG Analyse bestätigt (Abbildung 9).

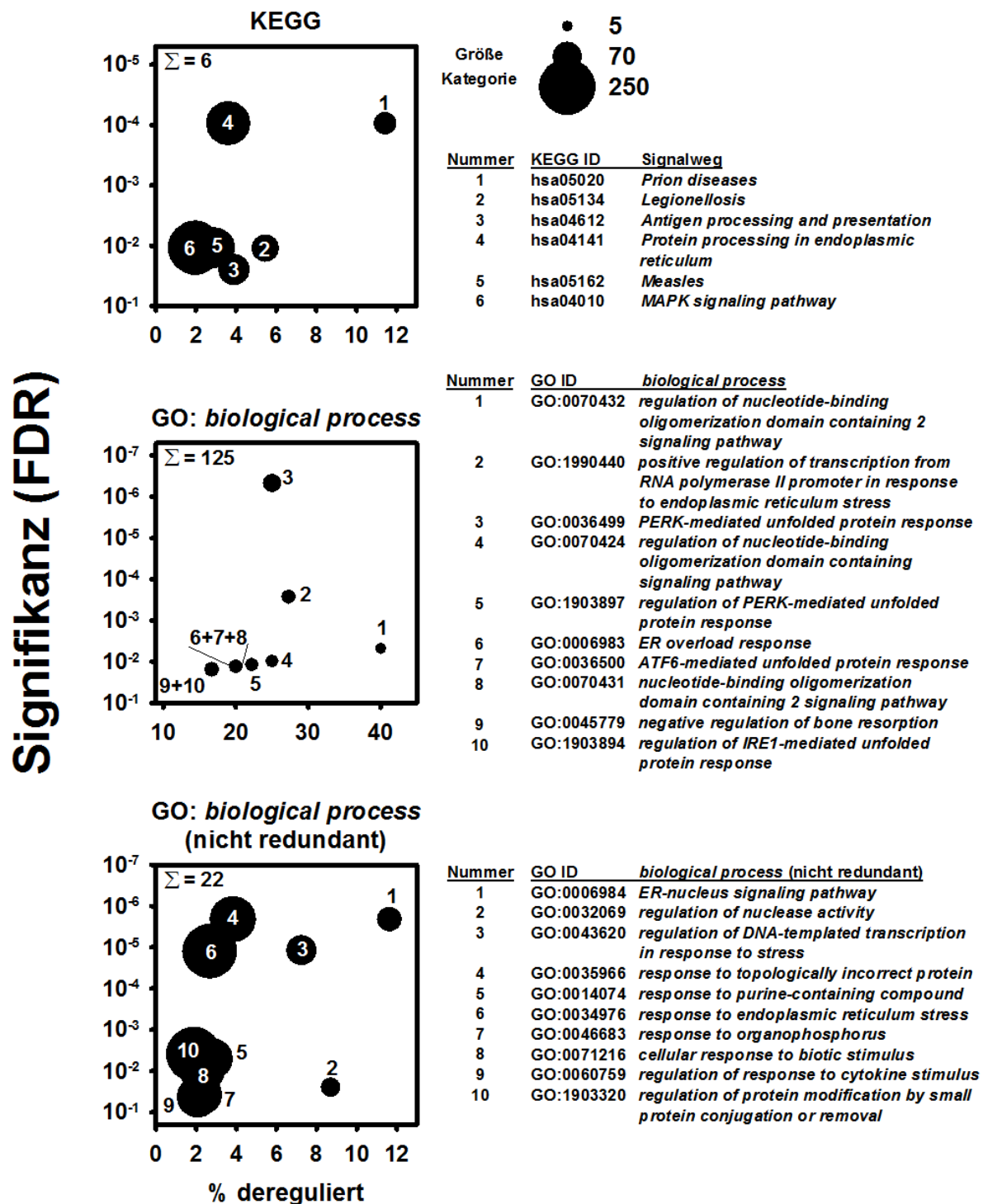
48 h HCoV-229E / 48 h HCoV-229E_{inaktiv}

Abbildung 9: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in A549 Zellen nach einer 48-stündigen Infektion. Für die 37 in Abbildung 8 dereguliert gemessenen Gene (48 h HCoV-229E/ 48 h HCoV-229E_{inaktiv}) wurde mit Hilfe des *onlinetools* „WebGestalt“ (Zhang, Kirov et al. 2005) eine Anreicherungsanalyse für KEGG Signalwege und GO Kategorien durchgeführt (*overrepresentation enrichment analysis* (ORA) gegen das humane Genom beschränkt auf Signalwege/Kategorien mit 5 bis 2000 Genen; *false discovery rate* (FDR) < 0,05 (Benjamini Hochberg korrigiert)). Dargestellt sind die 10 am stärksten mit deregulierten Genen angereicherten Kategorien für KEGG Signalwege, sowie die GO Klasse *biological process* (redundant und nicht redundant)

5 Ergebnisse

in Abhängigkeit der dazugehörigen FDR. Für die GO Klassen *cellular component* und *molecular function* wurden keine angereicherten Kategorien nachgewiesen. Die Kreisgröße entspricht der Anzahl an annotierten Genen für die jeweiligen Signalwege/Kategorien. Die Gesamtanzahl an dereguliert gefundenen Signalwegen/Kategorien ist in jedem Plot angegeben (Σ).

Obwohl durch die initiale *microarray*-basierte Analyse ein spezifischer Satz an HCoV-229E abhängig deregulierten Genen nachgewiesen werden konnten, war die geringe Anzahl unerwartet. Vor allem für verschiedene weitere Coronaviren wie *feline infectious peritonitis virus* (FIPV) und MERS-CoV konnten in ähnlichen Studien mehrere hundert bis tausend deregulierte Gene nachgewiesen werden (Shuid, Safi et al. 2015; Coleman, Sisk et al. 2017). Da die Viruspropagationen wie auch die Titerbestimmungen in HuH7 Zellen durchgeführt wurden, sollte die tatsächliche Infektionseffizienz für A549 Zellen über indirekte Immunfluoreszenz bestimmt werden. Dafür wurden A549 Zellen für 16, 24 und 48 Stunden mit einer MOI von 1 infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit einem Antikörper, der spezifisch das virale *nucleocapsid* Protein (N Protein) bindet, gefärbt. Bereits nach 16 Stunden konnten infizierte Zellen in der Kultur eindeutig identifiziert werden. Die Analyse machte außerdem deutlich, dass nach 16 Stunden nur 0,05% der Zellen infiziert waren, was einer tatsächlichen MOI von 0,0005 entspricht. Außerdem offenbarte die Immunfluoreszenzfärbung, dass die Infektion sich nicht durch das Zellkulturmedium ausbreitet. Stattdessen kommt es zu einer lateralen Ausbreitung von einer infizierten Zelle auf die angrenzenden Zellen (Abbildung 10). Als Folge dessen ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den 37 HCoV-229E spezifisch dereguliert Genen (Abbildung 8 und Abbildung 9), die in der *microarray* Analyse nachgewiesen wurden, um die am stärksten deregulierten handelt. Expressionsänderungen auf einem niedrigeren Niveau können in einem System, dass auf der Analyse eines Gesamtzellextraktes basiert, nicht nachgewiesen werden, da die Effekte von den nicht infizierten Zellen überlagert werden. Darüber hinaus könnten die 37 deregulierten Gene aber auch in allen Zellen eine veränderte Expression, als Folge des bloßen Kontaktes mit den Viren, aufweisen. Im Folgenden wurde daher die Natur der Genexpressionsänderungen für verschieden Zellpopulationen nach einer HCoV-229E Infektion untersucht.

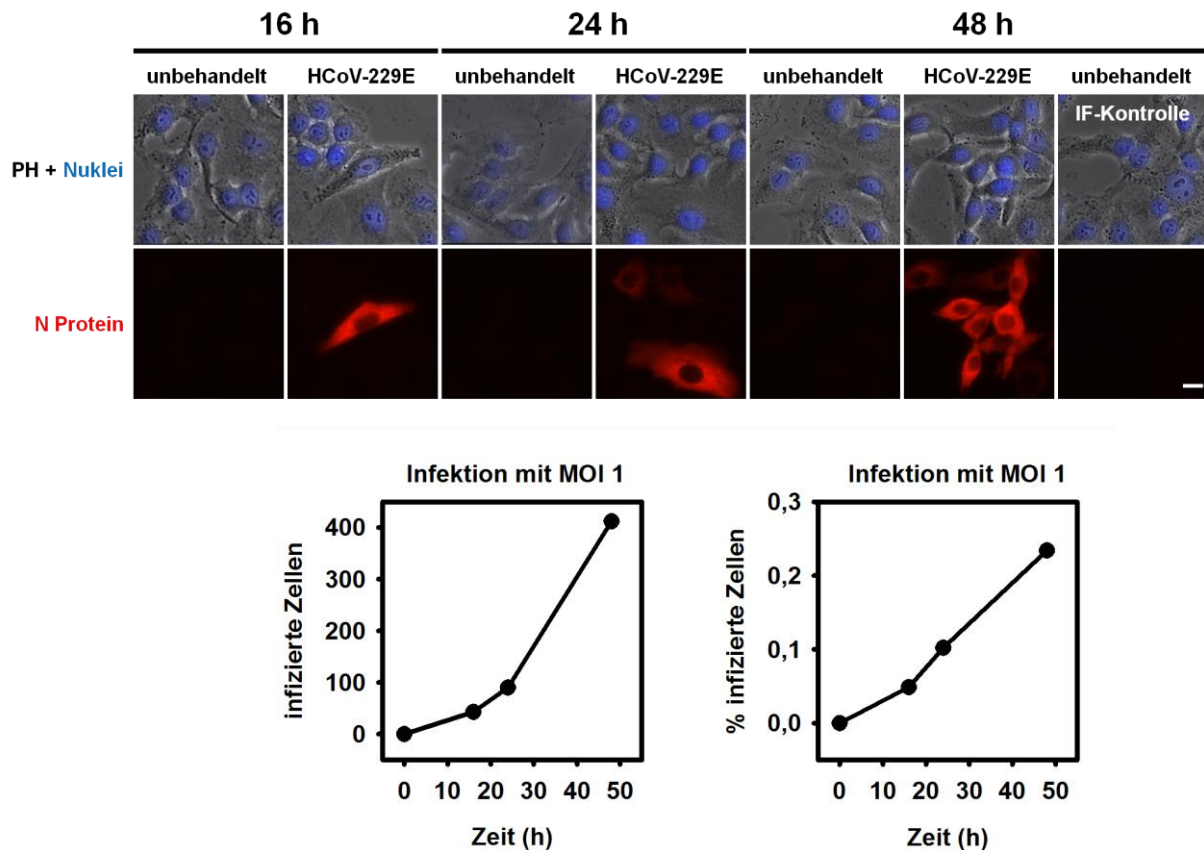


Abbildung 10: Validierung der Infektionseffizienz in A549 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die Zellen wurden nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 16, 24 oder 48 h in Kultur gehalten oder für die gleichen Zeitspannen nicht behandelt. Die Infektionseffizienz wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung (IF) des viralen N Proteins für alle Bedingungen ermittelt. Als IF-Kontrolle (ohne Primärantikörper) dienten Zellen, die unbehandelt für 48 h in Kultur gehalten wurden. Die Kernfärbung wurde mit Höchst durchgeführt. Maßstabsbalken = 15 µm. PH = Phasenkontrast. Für die Quantifizierung wurden alle infizierten Zellen in der entsprechenden Reaktionskammer des µ-Slide-IV gezählt. Außerdem wurde der prozentuale Anteil an infizierten Zellen berechnet. Für die Berechnung der Gesamtzahl an Zellen wurde zugrunde gelegt, dass 44000 Zellen ausgesät wurden und die Zellen sich alle 24 h verdoppeln.

5.1.2 Lasermikrodissektions (LMD) basierte Analyse der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort in humanen epithelialen alveolaren Adenokarzinomzellen (A549)

Die Tatsache, dass sich die HCoV-229E Infektion in A549 Zellen lateral ausbreitet, bot die Möglichkeit einzelne Zellpopulationen innerhalb einer Zellkultur per LMD voneinander zu separieren und zu analysieren. Da Immunfluoreszenzfärbungen in der Regel degradativ auf RNA Moleküle wirken (Fend, Emmert-Buck et al. 1999; Trogan, Choudhury et al. 2002), wurde zunächst ein verkürztes Immunfluoreszenzfärbungsprotokoll etabliert, um diesen Effekt zu eliminieren. Das Protokoll wurde auf A549 Zellen angewendet, die nach der Infektion für 48 Stunden in Kultur gehalten wurden. Anschließend wurden vier Zellpopulationen unter Verwendung eines Leica LMD6000 Systems voneinander separiert. Im Ersten Schritt wurden die infizierten Zellen mittels einer

Antikörper basierten N Protein Färbung dissektiert. Um zu analysieren, ob sich die Genexpression einer nicht infizierten Zelle durch den Kontakt mit einer infizierten Zelle ändert, wurden im zweiten Schritt Zellen, die direkt an infizierte Zellen angrenzen, dissektiert (Abbildung 11A). Außerdem sollte getestet werden, in wie weit die Anwesenheit von infizierten Zellen in einer Zellkultur die Genexpression nicht infizierter Zellen beeinflusst. Dafür wurden Zellen separiert, die mindestens 150 μ M von einer infizierten Zelle entfernt waren, welche im Folgenden als periphere Zellen bezeichnet werden (Abbildung 11B). Als Kontrolle wurden außerdem Zellen aus einer unbehandelten Zellkultur gewonnen (Abbildung 11C). Die RNA der Zellpopulationen wurde isoliert, um anschließend die Expression von acht der 37 initial nachgewiesenen HCoV-229E spezifisch deregulierten Gene (*EGR1*, *DDIT3*, *HERPUD1*, *ATF3*, *IL6*, *DUSP1*, *DNAJB9*, *TNFAIP3*) zu überprüfen. Dabei sind *DDIT3*, *DNAJB9*, *HERPUD1* und *ATF3* Komponenten des ER Stress Signalweges (Ma and Hendershot 2004), während *EGR1*, *IL6*, *DUSP1* und *TNFAIP3* eine Rolle im proinflammatorischen Signalweg spielen. Die Messung zeigte eine Induktion aller Zielgene ausschließlich in infizierten Zellen. Darüber hinaus konnte eine Induktion der Expression des proinflammatorischen Chemokines *IL8*, sowie die virale Transkription anhand der Messung von *RNAI* nachgewiesen werden (Abbildung 11D).

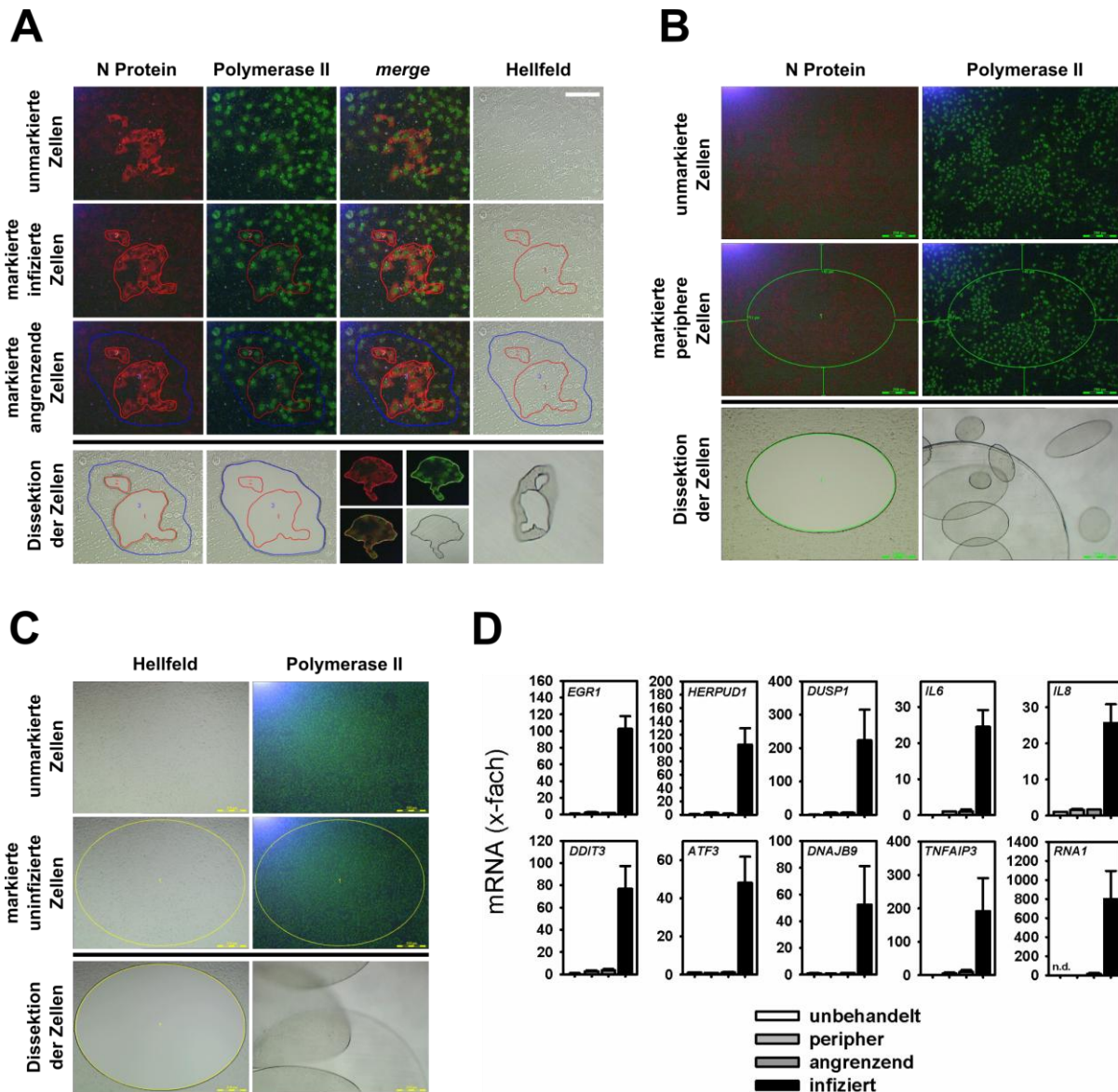


Abbildung 11: Isolation von infizierten A549 Zellen mittels Lasermikrodissektion (LMD) und anschließender RT-qPCR Analyse. A549 Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten für LMD Versuche in *WillCo dishes* ausgesät. Die Zellen wurden nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 48 Stunden in Kultur gehalten oder für die gleiche Zeitspanne nicht behandelt. Anschließend wurde eine indirekte LMD Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Danach wurden vier verschiedene Zellpopulationen voneinander getrennt: (A) Dissektion infizierter Zellen erkennbar an der N Protein Färbung, sowie angrenzender Zellen, die in direkter Nachbarschaft zu infizierten Zellen liegen (Maßstabsbalken = 100 µm), (B) Dissektion peripherer Zellen, die einen Abstand von mindestens 150 µm zu einer infizierten Zellen aufweisen (Maßstabsbalken = 200 µm). (C) Dissektion nicht infizierter Zellen, die aus dem unbehandelten *WillCo dish* gewonnen wurden (Maßstabsbalken = 310 µm). (D) Die mRNA Expression der angegebenen Wirtsgene, sowie des viralen RNA Abschnitts für *NSP8 (RNA1)* wurde mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. relativ zur unbehandelten Kontrolle (Wirtsgene), oder zu Zellen, die entfernt von Infizierten Zellen isoliert wurden (*RNA1*). n.d. = nicht detektierbar (Poppe, Wittig et al. 2017)

Die RNA von zwei der drei durchgeführten LMD Experimente wurde daraufhin für *microarray* Analysen verwendet. Um die Vergleichbarkeit zur ersten *microarray* Analyse zu gewährleisten, wurde für die Determinierung HCoV-229E spezifisch deregulierter Gene erneut eine *noise band* Analyse gewählt. Es zeigte sich, dass in den infizierten gegenüber den unbehandelten Zellen 152 Gene, in den infizierten gegenüber den peripheren Zellen 141 Gene und in den infizierten gegenüber den angrenzenden Zellen 117 Gene als signifikant dereguliert klassifiziert werden konnten. Kreuzvergleicht man die drei nicht infizierten Zellpopulationen untereinander, so können insgesamt nur vier Gene nachgewiesen werden, die außerhalb der *noise band* Grenzen liegen. Dementsprechend scheint die Wirtszellantwort zumindest in A549 Zellen auf die infizierten Zellen begrenzt zu sein. Aufgrund dessen wurden die Expressionswerte der drei nicht infizierten Zellpopulationen gemittelt (*pool* Kontrollen), um eine robustere Aussage über die HCoV-229E spezifisch deregulierten Gene in infizierten Zellen zu erhalten. Verglichen mit den gemittelten Kontrollen konnten in infizierten Zellen 176 spezifisch deregulierte Gene nachgewiesen werden, wobei der Großteil der Gene induziert wird (Abbildung 12).

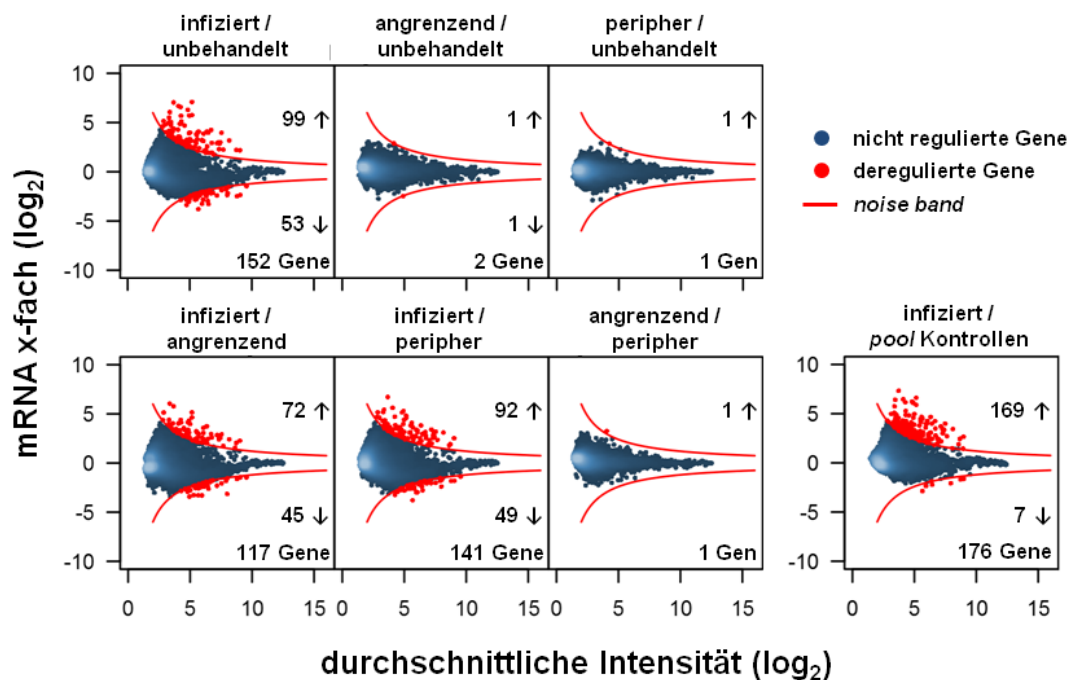


Abbildung 12: Microarray Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten Wirtsgenen in A549 Zellen aus LMD isolierten Zellpopulationen. Die gesamte RNA aus LMD isolierten A549 Zellpopulationen wurde in zwei unabhängigen Experimenten für eine Messung der Transkriptomdaten via *Agilent® microarrays* verwendet. Die Ergebnisse wurden als MA Plots visualisiert, bei welchen die \log_2 transformierten Änderungen der Genexpressionen gegen die \log_2 transformierten gemittelten Abundanzen der Gene geplottet werden. Zur Ermittlung differenziell deregulierter Gene, wurde das bereits in Abbildung 8 verwendete „*noise band*“ auf alle gezogenen Vergleiche übertragen. Die außerhalb des jeweiligen „*noise band*“ liegenden rot markierten Wirtsgene sind HCoV-229E abhängig dereguliert. Da bei den Vergleichen der drei nicht infizierten Zellpopulationen nur vier deregulierte Gene ermittelt werden konnten, wurden die Expressionswerte dieser Populationen außerdem vereinigt (*pool* Kontrollen) und anschließend ebenfalls mit den Expressionswerten der infizierten Zellen verglichen. (Pope, Wittig et al. 2017)

Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse der beiden in A549 Zellen durchgeführten *microarray* Experimente gleichen, wurden die Expressionswerte aller relevanten Vergleiche aus beiden Experimenten in Form einer *heatmap* dargestellt (Abbildung 13), wobei nur die Expressionswerte der 37 initial als HCoV-229E spezifisch deregulierten Gene in Betracht gezogen wurden. Man kann erkennen, dass die 26 induzierten Gene der Bedingung HCoV-229E/HCoV-229E_{inaktiv} in den meisten Fällen auch unter der Bedingung HCoV-229E/unbehandelt und in den meisten Bedingungen des LMD Experimentes, wenn infizierte Zellen mit Kontrollen verglichen werden, induziert waren, was impliziert, dass es sich bei diesen Genen um relevante Faktoren für die HCoV-229E spezifische Wirtsantwort handelt. Für die 11 in dem Vergleich HCoV-229E/HCoV-229E_{inaktiv} reprimierten Gene konnte hingegen keine Regulation im Vergleich zu HCoV-229E/unbehandelt festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich für diese Gene eine starke Induktion für den Vergleich HCoV-229E_{inaktiv}/unbehandelt. Im LMD *microarray* waren diese Gene in den meisten Fällen nicht nachweisbar exprimiert, sodass die Möglichkeit besteht, dass es sich bei diesen Genen um falsch positive Messungen handelt. Eine endgültige Aussage zu deren Relevanz für die HCoV-229E spezifische Wirtsantwort kann daher nicht getroffen werden. Vor allem aber für die induzierten Gene rekapituliert und erweitert das LMD basierte *microarray* Experiment die Ergebnisse des initialen *microarrays*.

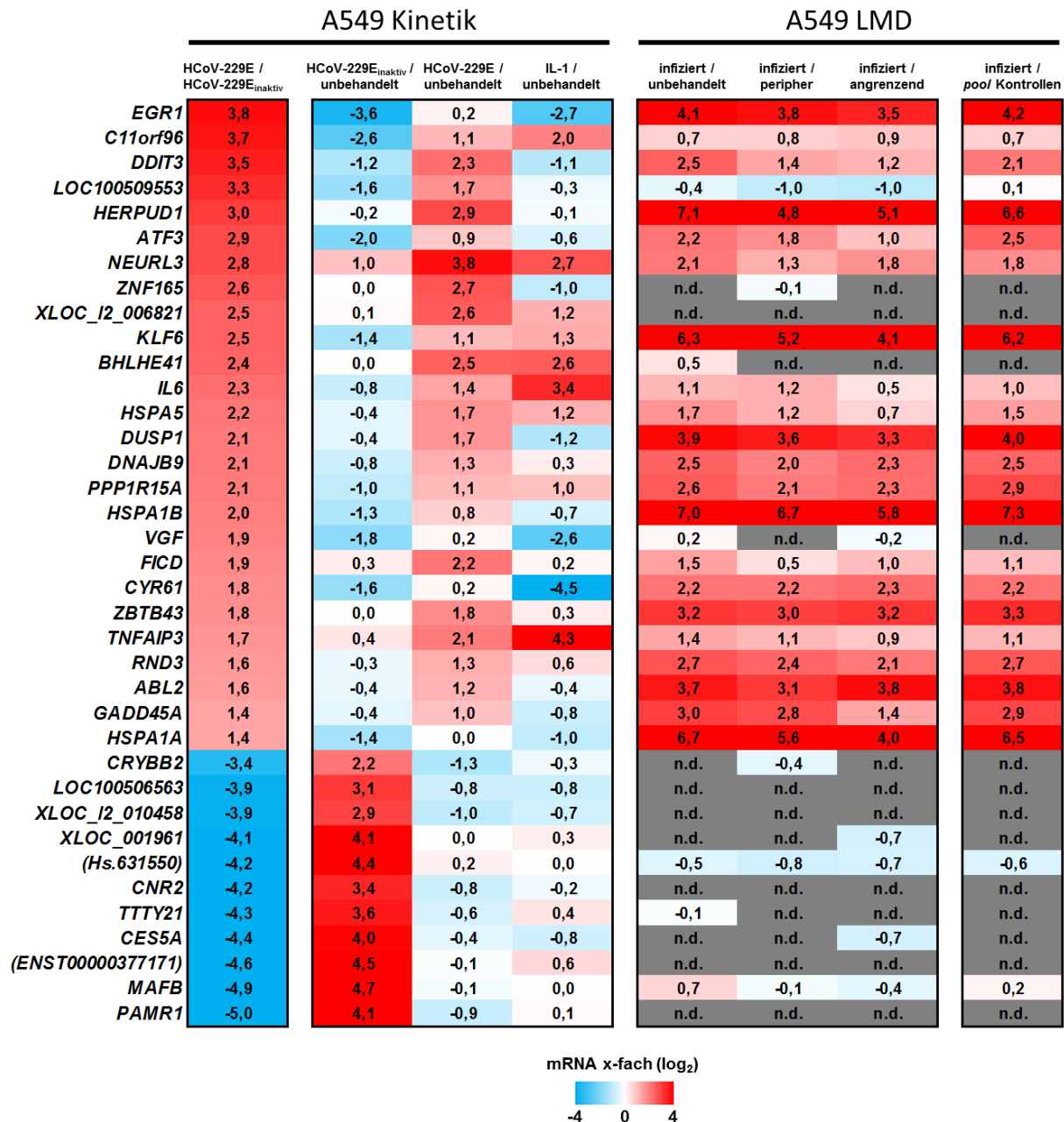


Abbildung 13: Heatmap zur Gegenüberstellung der microarray Ergebnisse der A549 Kinetik und des A549 LMD Experiments. Dargestellt sind die log₂ transformierten x-fachen Änderungen der mRNA Expression aus vier Vergleichen des A549 Kinetik Experimentes (48 h HCoV-229E/48 h HCoV-229E_{inaktiv}; 48 h HCoV-229E_{inaktiv}/unbehandelt; 48 h HCoV-229E/unbehandelt; IL-1a/unbehandelt) und vier Vergleichen des LMD Experimentes (infiziert/unbehandelt; infiziert/entfernt; infiziert/angrenzend; infiziert/pool Kontrollen). Die 37 dargestellten Gene entsprechen den 37 als dereguliert nachgewiesenen Genen aus Abbildung 8 unten rechts (48 h HCoV-229E/48 h HCoV-229E_{inaktiv}). n.d. = nicht detektierbar (Poppe, Wittig et al. 2017)

Daher wurde überprüft, ob die 176 gegenüber den gemittelten Kontrollen deregulierten Gene in einem funktionellen Zusammenhang stehen. Es wurde eine ORA für KEGG Signalwege und GO Kategorien durchgeführt. Diese zeigte, dass es eine Anreicherung für drei KEGG Signalwege gibt, wobei zwei dieser Signalwege bereits im initialen *microarray* Experiment mit deregulierten Genen angereichert waren (hsa05134 *Legionellosis* und hsa04141 *Protein processing in endoplasmic reticulum*) (Abbildung 9 und Abbildung 14 oben). Für den Signalweg *Protein processing in endoplasmic reticulum* wurden deshalb die x-fachen Änderungen der Expression (\log_2 transformiert) sowohl für den 48 Stunden Zeitpunkt des ersten *microarray* Experiments, als auch für den Vergleich der per LMD isolierten infizierten Zellen gegenüber dem *pool* der nicht infizierten Zellen, auf die zugehörige Signalwegkarte übertragen. Dies verdeutlicht, dass der Großteil der für diesen Signalweg relevanten Gene durch die Infektion transkriptionell induziert wird (Abbildung 15). Darüber hinaus konnten für die GO Klasse *biological process* 160 angereicherte Kategorien ermittelt werden. Die am stärksten angereicherten Kategorien enthalten Gene, die relevant sind für eine Ribonukleaseaktivität, das Beladen von Vesikeln, aber auch für den Proteinexport vom ER oder den Transport von Viren (GO:0060700 *regulation of ribonuclease activity*; GO:0035459 *cargo loading into vesicle*; GO:0032527 *protein exit from endoplasmic reticulum*; GO:0046794 *transport of virus*). Darüber hinaus wurde die Anreicherungsanalyse für die GO Klasse *biological process* mit einer weniger redundanten Datenbank wiederholt. Auf diese Weise wurden 22 mit deregulierten Genen angereicherte Kategorien gefunden, wobei diese Gene enthielten, die relevant sind für eine Aktivierung des ER Stress Signalweges (GO:0035966 *response to topologically incorrect protein*; GO:0034976 *response to endoplasmic reticulum stress*), aber auch Gene die relevant sind für die Translationsinitiation und den NF- κ B Signalweg (GO:0006413 *translational initiation*; GO:0038061 *NIK/NF-kappaB signaling*)(Abbildung 14 mitte und unten).

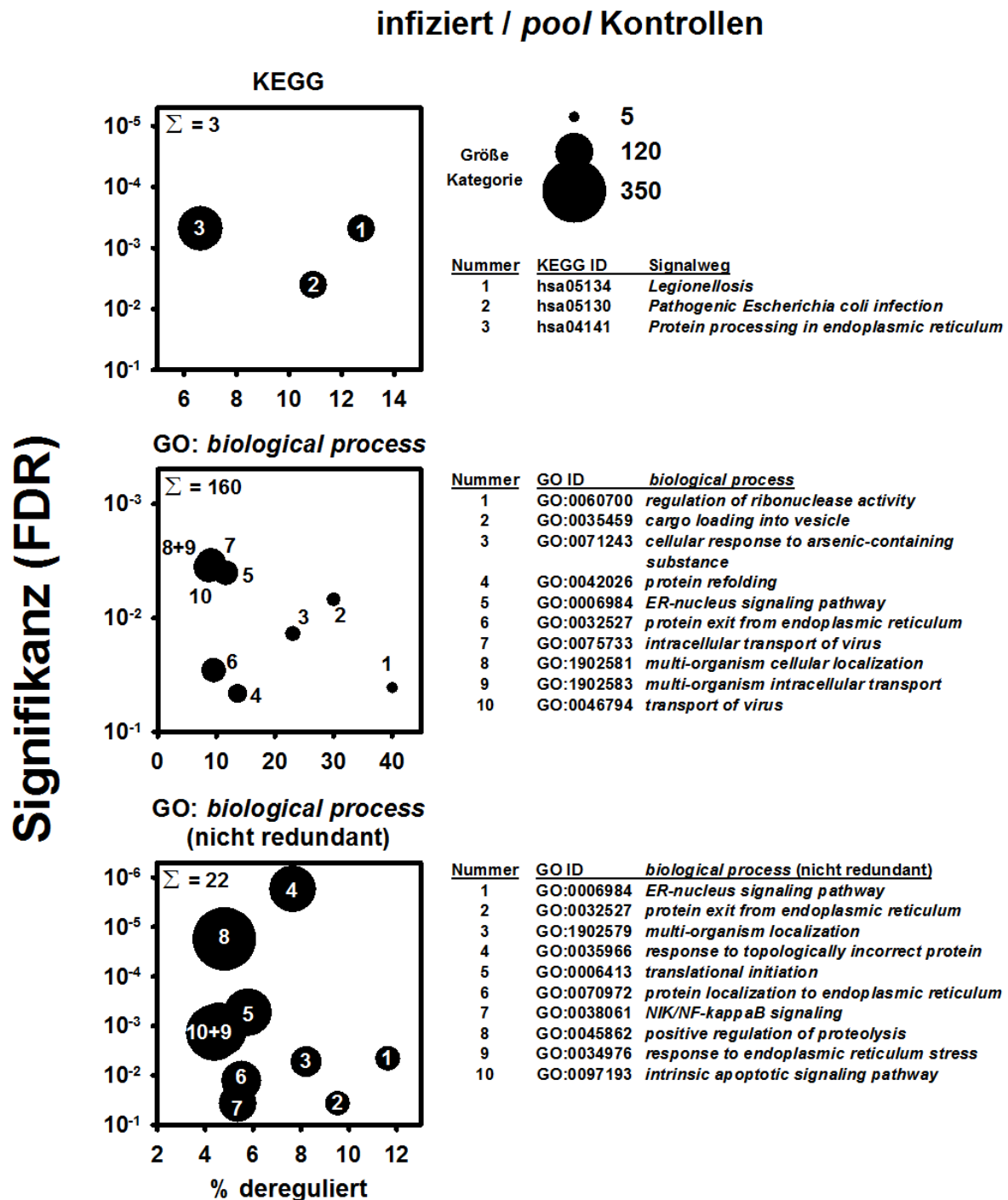
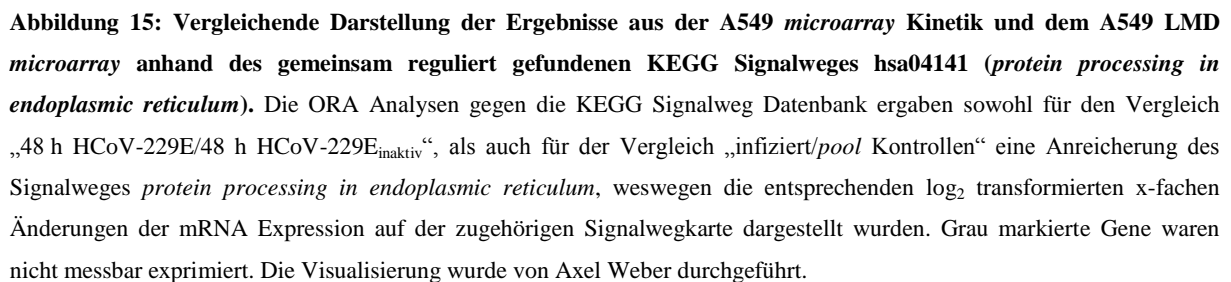


Abbildung 14: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in A549 Zellen auf Basis des LMD Versuchs. Für die 176 in (Abbildung 12) dereguliert gemessenen Gene (infiziert/pool Kontrollen) wurde mit Hilfe des *onlinetools* „Webgestalt“ (Zhang, Kirov et al. 2005) eine Anreicherungsanalyse für KEGG Signalwege und GO Kategorien durchgeführt (*overrepresentation enrichment analysis* (ORA) gegen das humane Genom beschränkt auf Signalwege/Kategorien mit 5 bis 2000 Genen; *false discovery rate* (FDR) < 0,05 (Benjamini Hochberg korrigiert)). Dargestellt sind die 10 am stärksten mit deregulierten Genen angereicherten Kategorien für KEGG Signalwege, sowie die GO Klasse *biological process* (redundant und nicht redundant) in Abhängigkeit der dazugehörigen FDR. Die Kreisgröße entspricht der Anzahl an annotierten Genen für die jeweiligen Signalwege/Kategorien. Die Gesamtanzahl an dereguliert gefundenen Signalwegen/Kategorien ist in jedem Plot angegeben (Σ).



Obwohl durch die bisherigen *microarray* Experimente unter Verwendung von A549 Zellen ein robuster Satz an HCoV-229E spezifisch deregulierten Gene ermittelt werden konnte, haben die Experimente eine intrinsische Schwäche. Bei einer Infektion über 48 Stunden, die sich lateral in der Zellkultur ausbreitet, sind die meisten Zellen höchstwahrscheinlich für kürzere Zeiträume infiziert, was sowohl auf die Kinetik, als auch auf das LMD Experiment zutrifft. Dementsprechend eignen sich die gemessenen Signale für eine qualitative Auswertung, aber um quantitativ belastbare Daten zu generieren, muss eine Zelllinie verwendet werden, in der sichergestellt werden kann, dass alle Zellen gleichzeitig infiziert werden. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein weiterer *microarray* basierter Transkriptomdatensatz in HuH7 Zellen erhoben.

5.1.3 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort in epithelialen von Hepatozyten abgeleiteten Karzinomzellen (HuH7).

Um den idealen Zeitpunkt für eine sich anschließende *microarray* Analyse zu determinieren, wurde zunächst eine Infektionskinetik durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurden anschließend die Expressionsänderung der neun Gene gemessen, die bereits in LMD isolierten infizierten A549 Zellen als induziert nachgewiesen werden konnten (Abbildung 11D). Es zeigte sich, dass jedes der Gene in HuH7 Zellen bereits nach 16 Stunden messbar induziert wird. Die Expression steigt dabei bis zum 48 Stunden Zeitpunkt stetig an. Die einzige Ausnahme bildet *IL6*, welches bereits nach 16 Stunden seine maximale Expression erreicht und danach nicht weiter induziert wird. Da die Zellen 48 Stunden nach der Infektion bereits zytopathische Effekte aufwiesen, wurde entschieden, dass die Zellen für die nachfolgenden *microarray* Experimente für 24 Stunden infiziert werden.

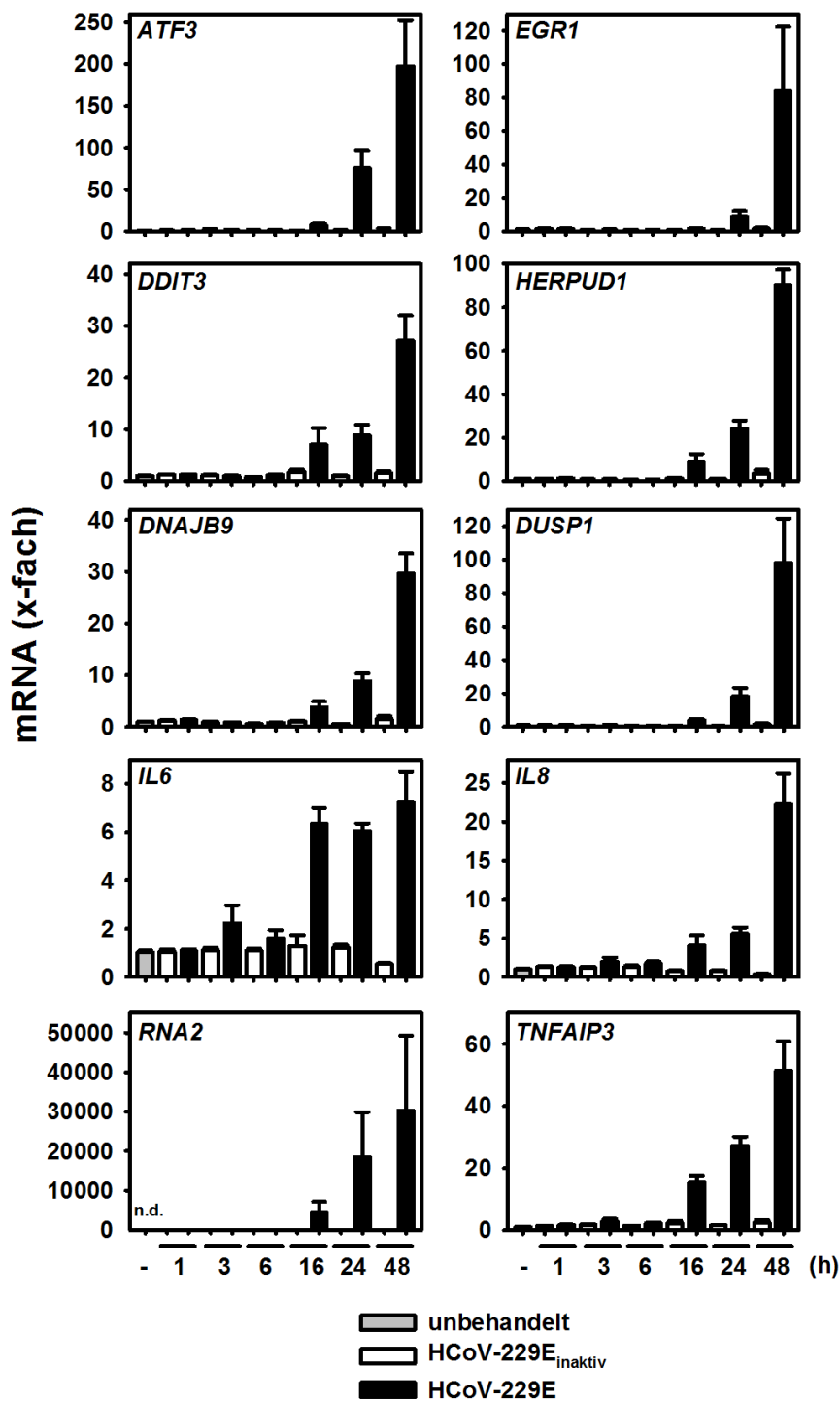


Abbildung 16: Die in A549 Zellen identifizierten HCoV-229E spezifisch deregulierten Zielgene werden auch in HuH7 Zellen induziert. Die Zellen wurden nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 1, 3, 6, 16, 24 oder 48 h in Kultur gehalten oder für die gleichen Zeitspannen mit einem hitzeinaktivierten Virusüberstand behandelt, oder nicht behandelt. Die mRNA Expressionen von *ATF3*, *EGR1*, *DDIT3*, *HERPUD1*, *DNAJB9*, *DUSP1*, *IL8*, *IL6* und *TNFAIP3*, sowie des viralen RNA Abschnittes, der für das *spike* Protein (*RNA2*) kodiert wurden mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von drei (unbehandelt und HCoV-229E) oder zwei (HCoV-229E_{inaktiv}) unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle (Wirtsgene), oder zum ersten Infektionszeitpunkt (*RNA2*). n.d. = nicht detektierbar (Poppe, Wittig et al. 2017)

Für die folgende Analyse wurden HuH7 Zellen in vier Experimenten mit einer MOI von 1 infiziert und anschließend für 24 Stunden in Kultur gehalten. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen. In zwei Experimenten wurden außerdem Zellen mit hitzeinaktiviertem Virusüberstand behandelt, oder für eine Stunde mit IL-1a stimuliert. Die resultierenden Expressionswerte wurden für jede Bedingung gemittelt, um anschließend die x-fachen Änderungen der mRNA Expression zu ermitteln. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden außerdem verschiedene Gene, die definierte Qualitätsmerkmale nicht erfüllten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse des *microarrays* in HuH7 Zellen die Ergebnisse aus den A549 Zellen widerspiegeln. Dafür wurden die in A549 Zellen erhobenen Daten den HuH7 Daten in Form einer *heatmap* gegenübergestellt, die erneut auf die 37 initial als HCoV-229E spezifisch deregulierten Gene in A549 Zellen beschränkt wurde. Man erkennt, dass die meisten in A549 Zellen HCoV-229E spezifisch induzierten Gene auch in HuH7 Zellen eine starke Induktion der Expression zeigten. Davon ausgenommen sind die fünf Gene *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA5*, *XLOC_12_006821* und *VGF*, die wahrscheinlich zelltypspezifisch reguliert wurden. Ähnlich wie im LMD *microarray*, wurden die meisten reprimierten Gene nicht messbar exprimiert (Abbildung 17).

Da HuH7 Zellen im Gegensatz zu A549 vollständig infiziert werden können, wurde zunächst keine Filterung anhand von Schwellenwerten vorgenommen. Stattdessen wurden gene set enrichment analysis (GSEA) für alle Vergleiche durchgeführt, um festzustellen, ob es Anreicherungen für deregulierte Gene in KEGG Signalwegen oder GO Kategorien aller drei Klassen gibt, wobei nur die nicht redundante GO Datenbank verwendet wurden. Da GSEA die x-fachen Expressionsänderungen (\log_2) aller Gene miteinbezieht, bietet dies den Vorteil, dass auch vergleichsweise schwache Änderungen der Genexpression vieler Gene als signifikante Anreicherung von KEGG Signalwegen oder GO Kategorien wahrgenommen werden können. Darüber hinaus unterscheidet man bei GSEA auch zwischen induzierten und reprimierten Signalwegen/Kategorien. Die KEGG Analyse zeigt, dass es durch die HCoV-229E Infektion, unabhängig von der Kontrollbedingung zu einer Aktivierung von drei Signalwegen kommt (hsa04668 TNF signaling pathway, hsa04064 NF-kappa B signaling pathway und hsa04710 Circadian rhythm), wobei die ersten beiden auch im Rahmen einer IL-1a Stimulation aktiviert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Kontrollbedingung durch die HCoV-229E Infektion drei Signalwege reprimiert werden (hsa05012 Parkinson's disease, hsa00190 Oxidative phosphorylation und hsa05010 Alzheimer's disease). Darüber hinaus werden für jede Kontrolle zwei weitere Signalwege induziert und reprimiert. Vergleicht man IL-1a stimulierte Zellen mit unbehandelten Zellen kommt es zu einer erwarteten Aktivierung von Signalwegen, die relevant für den proinflammatorischen Prozesse sind (hsa04668 TNF signaling pathway, hsa04064 NF-kappa B signaling pathway, hsa05323 Rheumatoid arthritis, hsa04060 Cytokine-cytokine receptor interaction) (Abbildung 18 oben). Die Anreicherungsanalyse für die GO Klasse biological process ergab, dass es, wie bereits in A549 Zellen, durch die HCoV-229E Infektion zu einer Aktivierung der Kategorien response to topologically incorrect protein (GO:0035966); response to endoplasmic

reticulum stress (GO:0034976) und ER-nucleus signaling pathway (GO:0006984) kommt. Dies bestätigt, dass die Infektion mit HCoV-229E zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges führt. Generell konnten unabhängig von der Kontrollbedingung (unbehandelt oder hitzeinaktivierter Virusüberstand) jeweils über 50 angereicherte GO Kategorien determiniert werden, wohingegen es nur drei Kategorien gab, die unabhängig von der Kontrolle reprimiert waren (mitochondrial respiratory chain complex assembly GO:0033108, mitochondrial respiratory chain complex I biogenesis GO:0097031 und NADH dehydrogenase complex assembly GO:0010257). Dies stimmt mit der KEGG Analyse überein, da auch dort der Signalweg Oxidative phosphorylation als reprimiert nachgewiesen werden konnte (Abbildung 18 unten). Für die GO Klasse cellular component kommt es ebenfalls hauptsächlich zu einer Anreicherung von reprimierten Kategorien, die in Zusammenhang mit dem der mitochondrialen Atmungskette stehen (mitochondrial protein complex GO:0098798, respiratory chain GO:0070469, mitochondrial membrane part GO:0044455, oxidoreductase complex GO:1990204, mitochondrial inner membrane GO:0005743, cytochrome complex GO:0070069). Demgegenüber zeigte die Anreicherungsanalyse für die GO Klasse molecular function, dass es auch eine Vielzahl an Kategorien gibt, deren Gene HCoV-229E spezifisch aktiviert werden und die funktionell in Zusammenhang mit der nukleären Promotorbindung für Polymerase II abhängige Gene stehen (transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding GO:0000982, core promoter proximal region DNA binding GO:0001159, transcriptional activator activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding GO:0001228 transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding GO:0001227 core promoter binding GO:0001047) (Abbildung 19). Zusammenfassend zeigte die GSEA für KEGG Signalwege und GO Klassen, dass es in HuH7 Zellen zu einer HCoV-229E spezifischen Aktivierung des ER Stress Signalweges, einer partiellen Aktivierung des proinflammatischen Signalweges, einer transkriptionellen Reprimierung von Komponenten der mitochondrialen Atmungskette und einer Aktivierung von Polymerase II Promotor bindenden Faktoren kommt (Abbildung 18 und Abbildung 19).

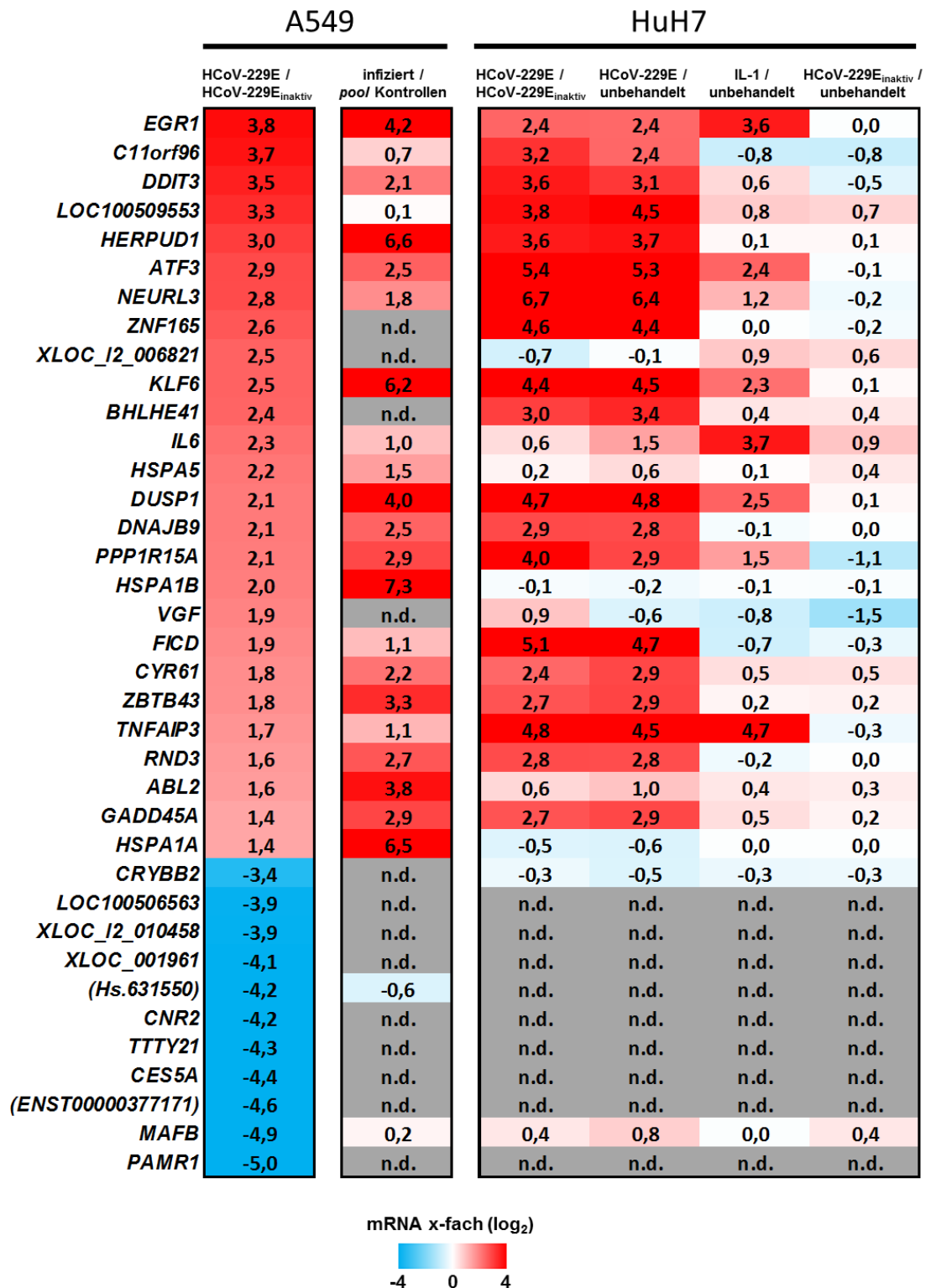


Abbildung 17: Heatmap zur Gegenüberstellung der microarray Ergebnisse aus A549 und HuH7 Zellen. Dargestellt sind die log₂ transformierten x-fachen Änderungen der mRNA Expression aus zwei Vergleichen der *microarrays* aus A549 Zellen (Kinetik: 48 h HCoV-229E/48 h HCoV-229E_{inaktiv}; LMD: infiziert/pool Kontrollen), sowie aus vier Vergleichen der *microarrays* aus HuH7 Zellen (24 h HCoV-229E/24 h HCoV-229E_{inaktiv}; 24 h HCoV-229E/unbehandelt; 1 h IL-1a/unbehandelt; 24 h HCoV-229E_{inaktiv}/unbehandelt;). Die 37 dargestellten Gene entsprechen den 37 dereguliert gefundenen Genen aus Abbildung 8 unten rechts (48 h HCoV-229E/48 h HCoV-229E_{inaktiv}). n.d. = nicht detektierbar (Poppe, Wittig et al. 2017)

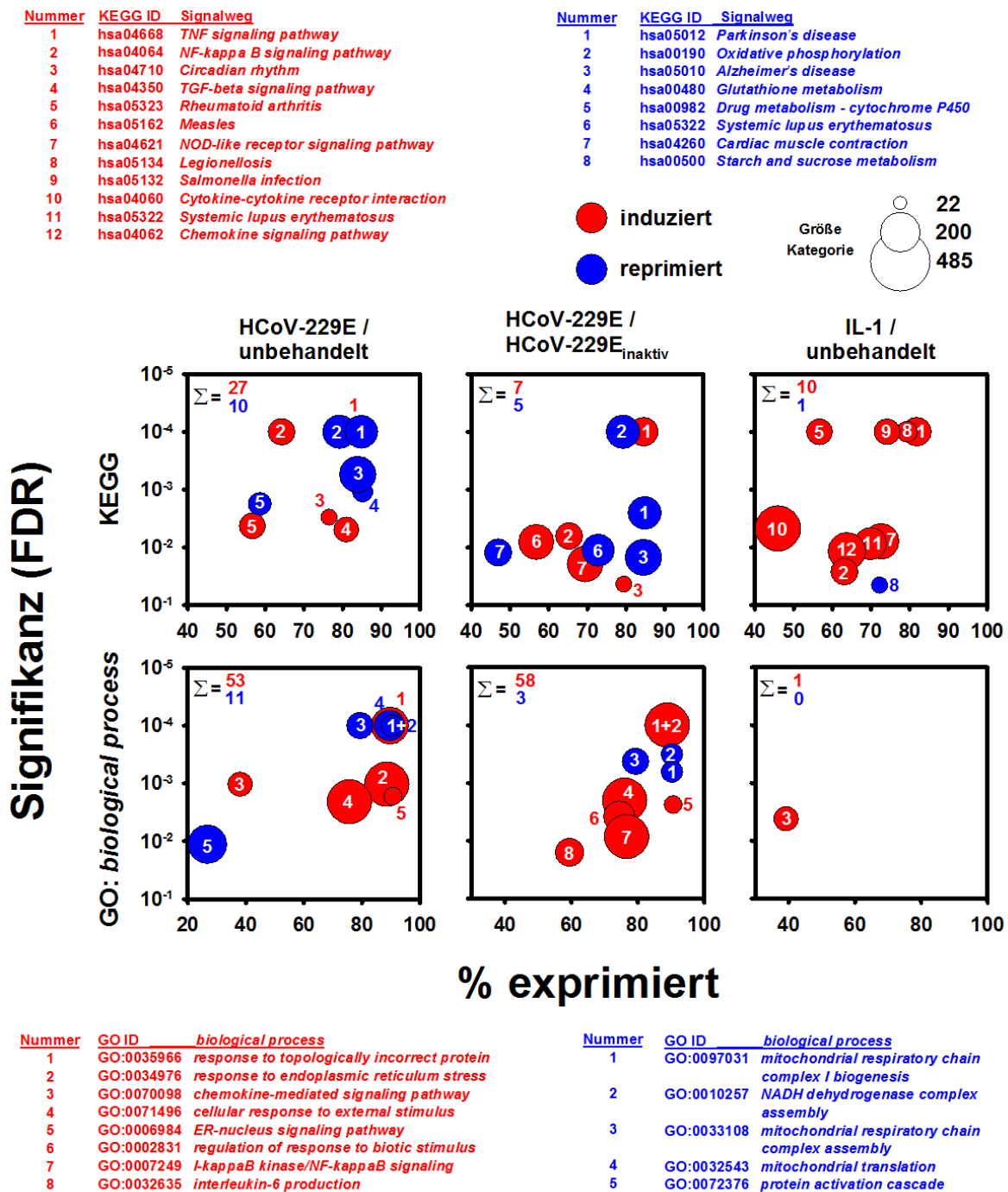


Abbildung 18: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in HuH7 Zellen im Vergleich mit IL-1a stimulierten Zellen. Für alle signifikant exprimierten Gene in den drei Vergleichen (24 h HCoV-229E/24 h HCoV-229E_{inaktiv}; 24h HCoV-229E/unbehandelt; 1 h IL-1a/unbehandelt) wurde mit Hilfe des *onlinetools* „Webgestalt“ (Zhang, Kirov et al. 2005) eine Anreicherungsanalyse für KEGG Signalwege und GO Kategorien durchgeführt (*gene set enrichment analysis* (GSEA) gegen das humane Genom beschränkt auf Signalwege/Kategorien mit 5 bis 2000 Genen; *false discovery rate* (FDR) < 0,05 (Benjamini Hochberg korrigiert)). Dargestellt sind die 5 Kategorien mit dem höchsten *normalized enrichment score* für reprimierte und induzierte KEGG Signalwege, sowie die GO Klasse *biological process* (nicht redundant). Für die dargestellten Signalwege/Kategorien wurde der prozentual gemessene Anteil an exprimierten Genen in Abhängigkeit der zugehörigen FDR geplottet. Die Kreisgröße entspricht der Anzahl an annotierten Genen für die jeweiligen Signalwege/Kategorien. Die Gesamtanzahl an dereguliert gefundenen Signalwegen/Kategorien ist in jedem Plot angegeben (Σ).

5 Ergebnisse

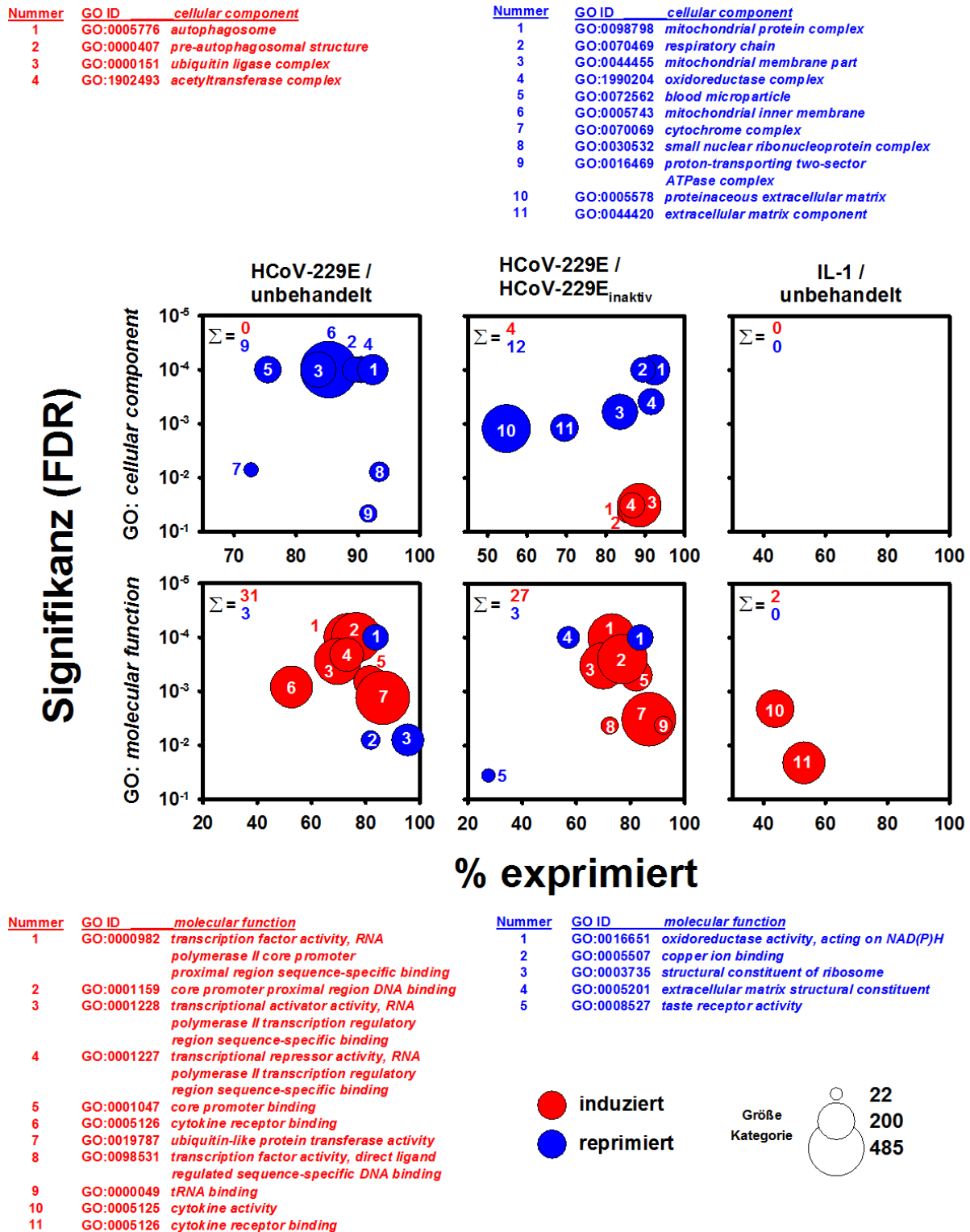


Abbildung 19: GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Komponenten und molekularen Funktionen in HuH7 Zellen im Vergleich mit IL-1a stimulierten Zellen. Für alle signifikant exprimierten Gene in den drei Vergleichen (24 h HCoV-229E/24 h HCoV-229E_{inaktiv}; 24 h HCoV-229E/unbehandelt; 1 h IL-1a/unbehandelt) wurde mit Hilfe des *onlinetools* „Webgestalt“ (Zhang, Kirov et al. 2005) eine Anreicherungsanalyse für GO Kategorien durchgeführt (*gene set enrichment analysis* (GSEA) gegen das humane Genom beschränkt auf Kategorien mit 5 bis 2000 Genen; *false discovery rate* (FDR) < 0,05 (Benjamini Hochberg korrigiert)). Dargestellt sind die 5 Kategorien

5 Ergebnisse

mit dem höchsten *normalized enrichment score* für die reprimierten und induzierten GO Klassen *cellular component* und *molecular function* (nicht redundant). Für die dargestellten Kategorien wurde der prozentual gemessene Anteil an exprimierten Genen in Abhängigkeit der zugehörigen FDR geplottet. Die Kreisgröße entspricht der Anzahl an annotierten Genen für die jeweiligen Kategorien. Die Gesamtanzahl an dereguliert gefundenen Kategorien ist in jedem Plot angegeben (Σ).

Da die KEGG Analyse zeigte, dass es durchaus Überschneidungen in der Aktivierung proinflammatorischer Prozesse durch eine IL-1 α Stimulation und eine HCoV-229E Infektion gibt, wurden die HuH7 Daten anhand eines 1,5-fachen (\log_2) Schwellenwertes gefiltert. Auf diese Weise konnten 463 Gene identifiziert werden, die unabhängig von der Kontrolle HCoV-229E spezifisch dereguliert waren. Durch die IL-1 α Behandlung wurden 310 Gene dereguliert. Bei 29 Genen konnte gezeigt werden, dass sie sowohl durch die Infektion als auch durch die IL-1 α Stimulation mindestens 1,5-fach (\log_2) reguliert waren. Aus diesem Grund wurden für die weitere Analyse auch Gene in Betracht gezogen, die in einer der Bedingungen 1,5-fach (\log_2) und in der zweiten Bedingung 1-fach (\log_2) dereguliert waren. Auf diese Weise konnten insgesamt 70 Gene determiniert werden, die sowohl durch eine IL-1 α Stimulation als auch durch eine HCoV-229E Infektion spezifisch reguliert werden (Abbildung 20).

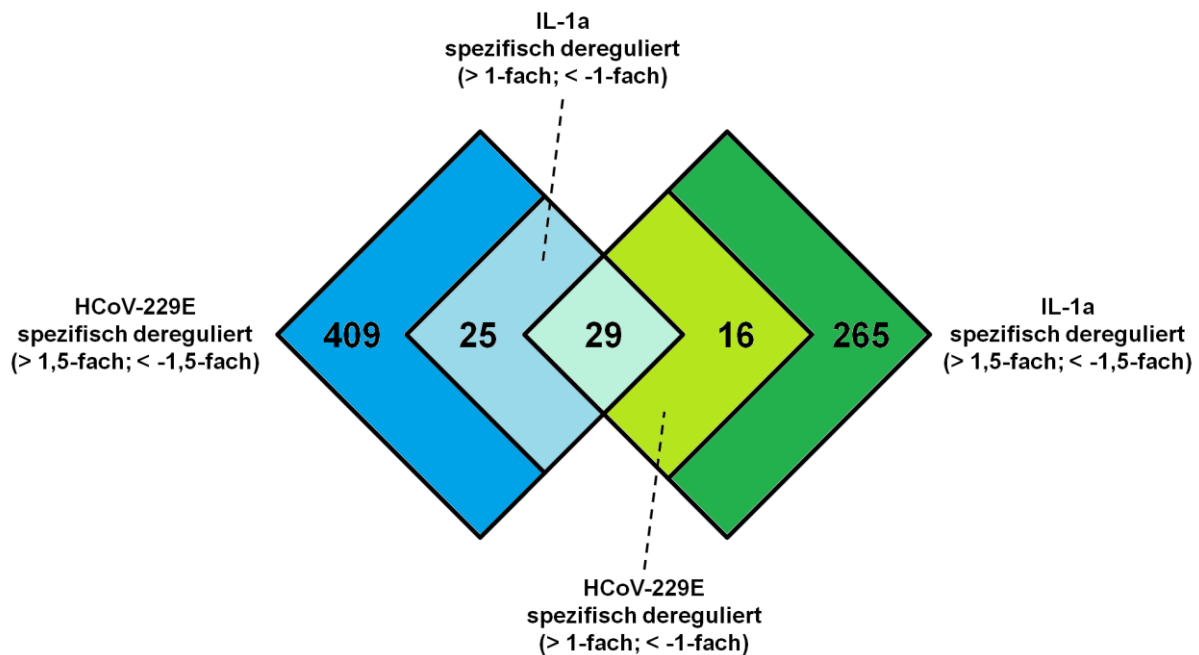


Abbildung 20: Grafische Darstellung aller mehr als 1,5-fach deregulierten Gene (\log_2) nach HCoV-229E Infektion oder IL-1 α Stimulation. Für alle signifikant exprimierten Gene in den drei Vergleichen (24 h HCoV-229E/24 h HCoV-229E_{inaktiv}; 24 h HCoV-229E/unbehandelt; 1 h IL-1 α /unbehandelt) wurde eine Filterung anhand eines 1,5-fach (\log_2) Schwellenwertes durchgeführt (blau und grün). Als Schnittmenge wurden Gene definiert, die eine 1,5-fache (\log_2) Regulation durch die HCoV-229E Infektion und eine 1-fache (\log_2) Regulation durch die IL-1 α Stimulation zeigten (hellblau), sowie Gene, die eine 1,5-fache (\log_2) Regulation durch die IL-1 α Stimulation und eine 1-fache (\log_2) Regulation durch die HCoV-229E Infektion zeigten (hellgrün) und Gene die in beiden Fällen eine 1,5-fache (\log_2) Regulation zeigten (türkis).

Um zu testen, ob die 70 Gene tatsächlich die relevanten Gene für die Aktivierung proinflammatorischer Prozesse sind, wurden sie für eine ORA gegen die Datenbanken für KEGG Signalwege und GO Klassen verwendet. Es zeigte sich, dass die am stärksten angereicherten Signalwege/Kategorien tatsächlich in direktem Zusammenhang mit proinflammatorischen Prozessen stehen (Abbildung 21).

Dies bedeutet aber auch, dass der Großteil der HCoV-229E spezifisch deregulierten Gene (409) nicht in Zusammenhang mit der Regulation des proinflammatorischen Signalweges steht. Dementsprechend müssen diese Gene für die Aktivierung der übrigen Prozesse verantwortlich sein, die in der initialen GSEA Filterung der HuH7 Daten determiniert werden konnten. Aus diesem Grund wurden die 409 ausschließlich durch eine HCoV-229E Infektion deregulierten Gene ebenfalls einer ORA gegen die Datenbanken für KEGG Signalwege und GO Klassen verwendet. Es zeigte sich, dass es zu keiner Anreicherung vom KEGG Signalwegen oder GO Kategorien der Klasse *cellular component* kommt. Für die GO Klassen *molecular function* und *biological process* (redundant und nicht redundant), kam es zur erwarteten Anreicherung für Prozesse, die in Zusammenhang mit dem ER Stress Signalweg und der nukleären Promotorbindung für Polymerase II abhängige Gene stehen (Abbildung 22).

70 HCoV-229E und IL-1a regulierte Gene

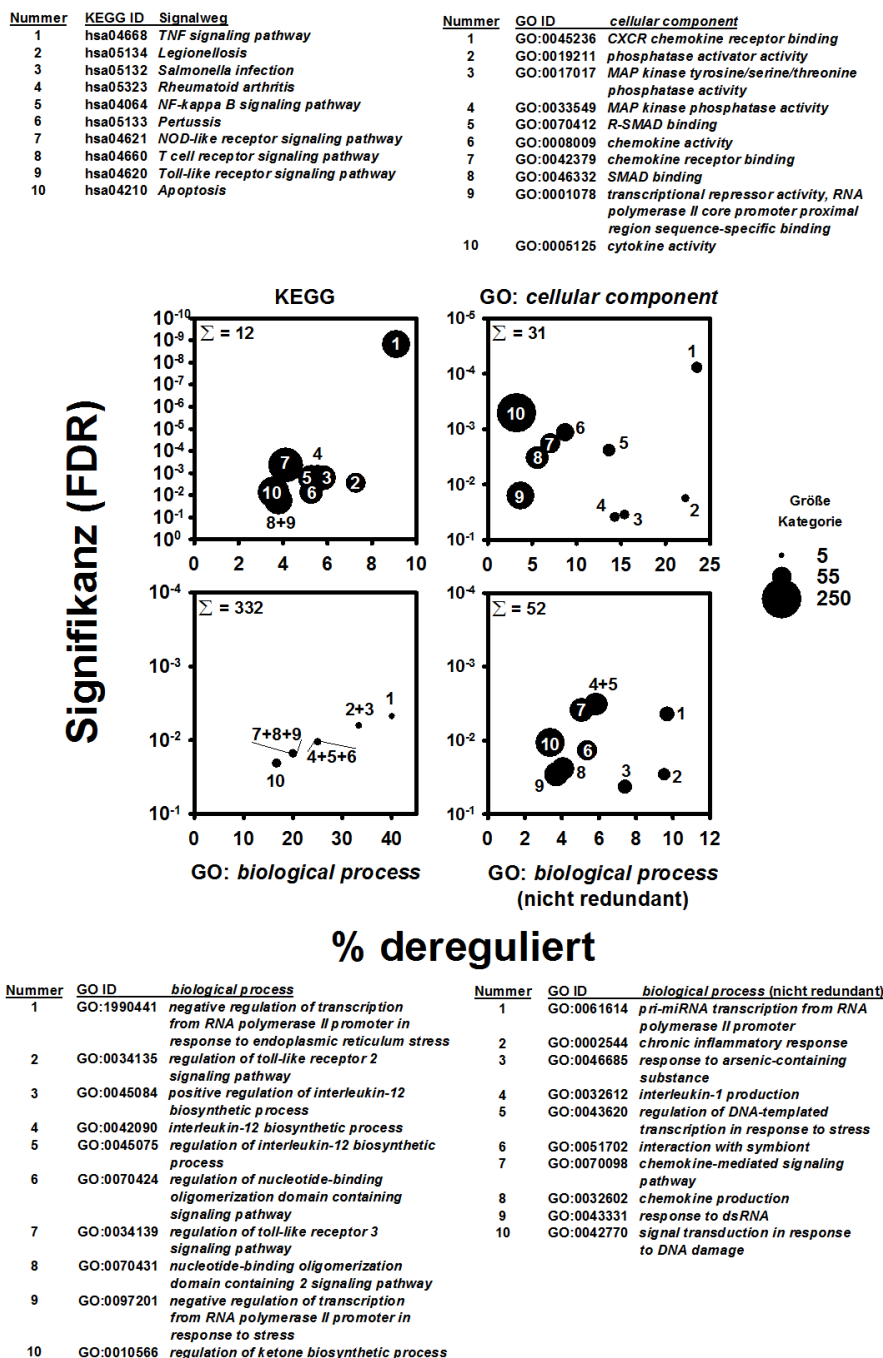


Abbildung 21: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E und IL-1a spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in HuH7 Zellen. Für die 70 in Abbildung 20 dereguliert gemessenen Gene wurde mit Hilfe des *onlinetools* „Webgestalt“ (Zhang, Kirov et al. 2005) eine Anreicherungsanalyse für KEGG Signalwege und GO Kategorien durchgeführt (*overrepresentation enrichment analysis* (ORA) gegen das humane Genom beschränkt auf Signalwege/Kategorien mit 5 bis 2000 Genen; *false discovery rate* (FDR) < 0,05 (Benjamini Hochberg korrigiert)). Dargestellt sind die 10 am stärksten mit deregulierten Genen angereicherten Kategorien für KEGG Signalwege sowie die GO Klassen *biological process* (redundant und nicht redundant) und *cellular component* (redundant) in Abhängigkeit der dazugehörigen FDR. Für die GO Klasse *molecular function* wurden keine angereicherten Kategorien gefunden. Die Kreisgröße entspricht der Anzahl an annotierten Genen für die jeweiligen Signalwege/Kategorien. Die Gesamtanzahl an dereguliert gefundenen Signalwegen/Kategorien ist in jedem Plot angegeben (Σ).

409 ausschließlich HCoV-229E regulierte Gene

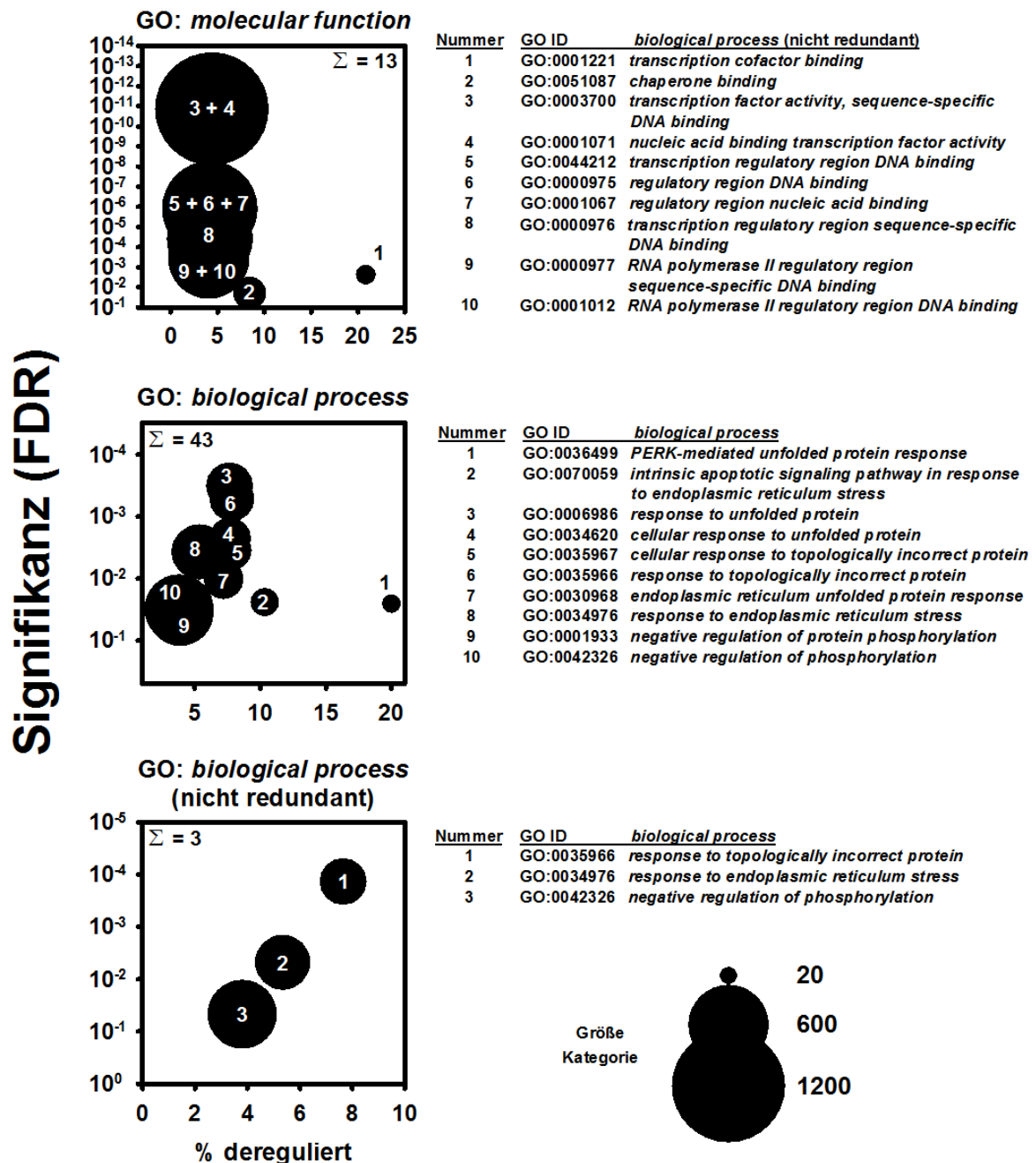


Abbildung 22: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von ausschließlich HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Prozessen in HuH7 Zellen. Für die 409 in Abbildung 20 HCoV-229E spezifisch dereguliert gemessenen Gene wurde mit Hilfe des *onlinetools* „Webgestalt“ (Zhang, Kirov et al. 2005) eine Anreicherungsanalyse für KEGG Signalwege und GO Kategorien durchgeführt (overrepresentation enrichment analysis (ORA) gegen das humane Genom beschränkt auf Signalwege/Kategorien mit 5 bis 2000 Genen; false discovery rate (FDR) < 0,05 (Benjamini Hochberg korrigiert)). Dargestellt sind die 10 am stärksten mit deregulierten Genen angereicherten Kategorien für die GO Klassen *biological process* (redundant und nicht redundant) und *molecular function* (redundant) in Abhängigkeit der dazugehörigen FDR. Für die GO Klasse *cellular component* und KEGG Signalwege wurden keine angereicherten Kategorien/Signalwege gefunden. Die Kreisgröße entspricht der Anzahl an annotierten Genen für die jeweiligen Signalwege/Kategorien. Die Gesamtanzahl an dereguliert gefundenen Signalwegen/Kategorien ist in jedem Plot angegeben (Σ).

Durch die vergleichende Analyse von HCoV-229E infizierten mit IL-1 α stimulierten HuH7 Zellen, konnte gezeigt werden, dass es einen spezifischen Satz an Genen gibt, der unter beiden Bedingungen dereguliert wird und Funktionen innerhalb proinflammatorischer Prozesse wahrnimmt. Darüber hinaus konnte ein weiterer Satz an Genen determiniert werden, der ausschließlich durch eine HCoV-229E Infektion dereguliert wird, wobei die funktionelle Analyse offenbarte, dass diese Gene Prozesse im ER Stress Signalweg steuern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Gene eine Rolle in der Regulation der Polymerase II abhängigen Promotor Bindung spielen. Über GSEA wurde zusätzlich nachgewiesen, dass es durch die HCoV-229E Infektion zu einer Reprimierung von Genen kommt, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen Atmungskette stehen.

5.1.4 Charakterisierung der Relevanz proinflammatorischer Prozesse für die virale Replikation und die Wirtszellantwort.

Da die *microarray* Studien belegen, dass eine HCoV-229E Infektion zu einer partiellen Aktivierung proinflammatorischer Prozesse auf Ebene des Transkriptoms führen, wurde untersucht, in wieweit dies über die klassischen IL-1 α abhängigen Signalkaskaden induziert wird. Dafür wurden HuH7 Zellen für bis zu 24 Stunden mit HCoV-229E infiziert und einer IL-1 α Stimulation für eine Stunde gegenübergestellt. Die *westernblot* basierte Analyse zeigte, dass es zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinasen JNK und p38, vor allem zu späten Zeitpunkten der Infektion, kommt. Die Phosphorylierung von p38 entspricht dabei der IL-1 α stimulierbaren Phosphorylierung, wohingegen die JNK Phosphorylierung schwächer induziert wird, als durch eine IL-1 α Stimulation. Darüber hinaus, konnte gezeigt werden, dass es zu einer verstärkten Translation der Transkriptionsfaktoren ATF3, KLF6 und JUN kommt, was die verstärkte mRNA Expression der dazugehörigen Gene in HuH7 Zellen rekapituliert. ATF3 gehört zu den PERK abhängig aktivierten Transkriptionsfaktoren und ist damit ein wichtiger Faktor des ER Stress Signalweges. Eine PERK Aktivierung führt normalerweise zu einer Phosphorylierung von EIF2 α an Serin 51, was ebenfalls im Laufe der Infektion nachgewiesen werden konnte. Diese Phosphorylierung induziert wiederum eine generelle Translationshemmung in den Zellen, obwohl es offensichtlich Faktoren gibt (ATF3, KLF6, JUN sowie die viralen Proteine), die von dieser globalen Hemmung nicht betroffen sind (Abbildung 23A)(Garcia, Meurs et al. 2007). Darüber hinaus wurde analysiert, inwieweit die HCoV-229E Infektion auch zu einer NF- κ B Aktivierung führt. In IL-1 α stimulierten Zellen kommt es in Folge der Stimulation zu einer Aktivierung des IKK Komplexes, der wiederum die Phosphorylierung von I κ B α an den Serinen 32 und 36 induziert. Dies führt über K48 verknüpfte Ubiquitinierung zum proteasomalen Abbau von I κ B α , wodurch der Transkriptionsfaktor p65 frei wird und in phosphorylierter Form in den Zellkern transloziert, um die Expression verschiedener IL-1 α abhängiger Zielgene zu induzieren (Gaestel, Kotlyarov et al. 2009). Obwohl die HCoV-229E Infektion scheinbar ähnliche MAP-Kinase Prozesse

induziert wie eine IL-1 α Stimulation, ist dies für den NF- κ B abhängigen Signalweg nicht der Fall. Es kommt im Gegensatz zur IL-1 α abhängigen Phosphorylierung des IKK Komplexes zu einer Degradierung der Untereinheiten IKKB und NEMO. Weiterhin konnte eine partielle Degradation von I κ B α beobachtet werden, obwohl im Gegensatz zur IL-1 α Stimulation keine I κ B α Phosphorylierung nachweisbar war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von p65 an Serin 536 abnimmt, wohingegen sie während einer IL-1 α Stimulation induziert wird. Außerdem kommt es zu einer Translationsinduktion des Suppressors des proinflammatorischen Signalweges TNFAIP3 (Abbildung 23B).

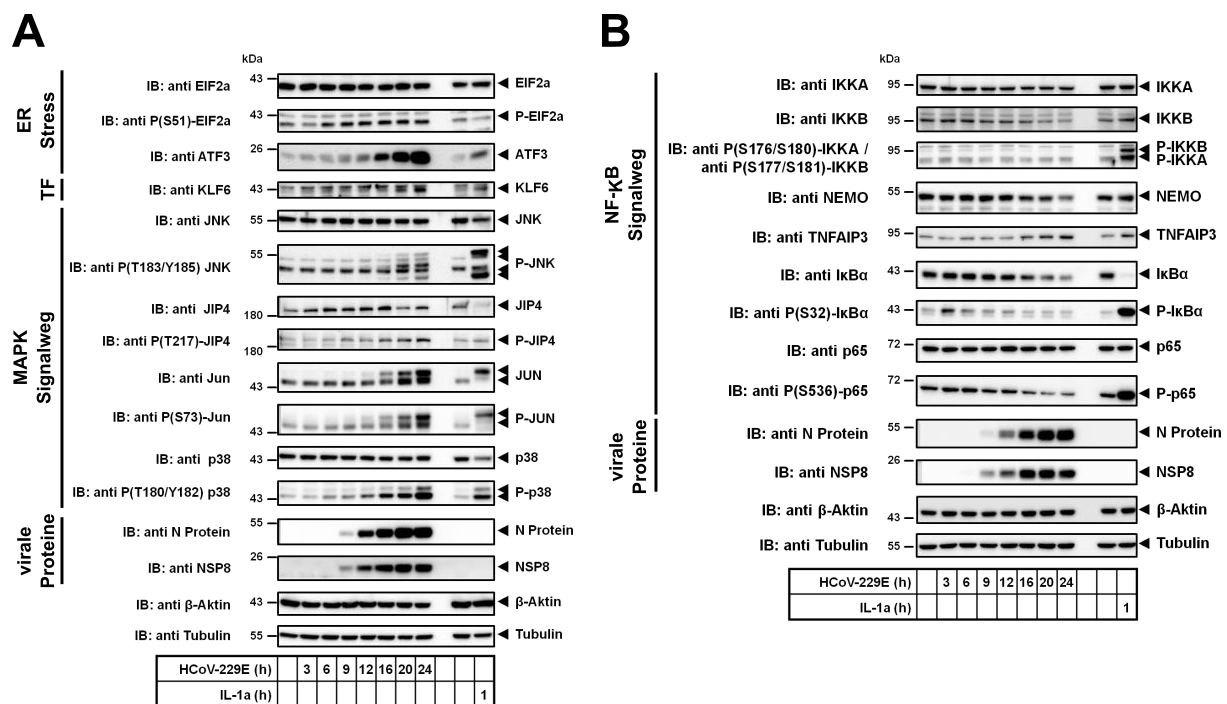


Abbildung 23: Differenzielle Aktivierung des proinflammatorischen Signalweges durch HCoV-229E und IL-1 α sowie der ER Stress Antwort durch HCoV-229E. HuH7 Zellen wurden nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 3, 6, 9, 12, 16, 20 oder 24 h in Kultur gehalten. Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes Tubulin und β -Aktin dienten als Ladungskontrolle. Zum Vergleich wurden außerdem Zellen für eine Stunde mit IL-1 α (10 ng/ml) stimuliert. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot; TF = Transkriptionsfaktor (A) Dargestellt sind die Ergebnisse für den MAPK-Signalweg und den ER Stress Signalweg. TF = Transkriptionsfaktor (B) Dargestellt sind die Ergebnisse für den NF- κ B Signalweg. (Poppe, Wittig et al. 2017)

Aufgrund der nachgewiesenen untypischen Aktivierung des NF- κ B Signalweges, wurde überprüft, ob die HCoV-229E abhängige partielle Degradierung von I κ B α auch zu einer Kerntranslokation von p65 führt. Dafür wurden HuH7 und HeLa Zellen infiziert und anschließend per indirekter Immunfluoreszenzfärbung (IF) analysiert. Es zeigte sich, dass die HCoV-229E Infektion tatsächlich eine partielle Kerntranslokation von p65 in beiden Zelllinien induziert, wohingegen eine IL-1 α

Stimulation zu einer fast vollständigen Kerntranslokation führt (Abbildung 24). Bestätigt wurde dies in *westernblot* Experimenten, in denen infizierte Zellen einer fraktionierten Lyse unterzogen wurden (Dissertation Sascha Wittig, AG Kracht)(Poppe, Wittig et al. 2017).

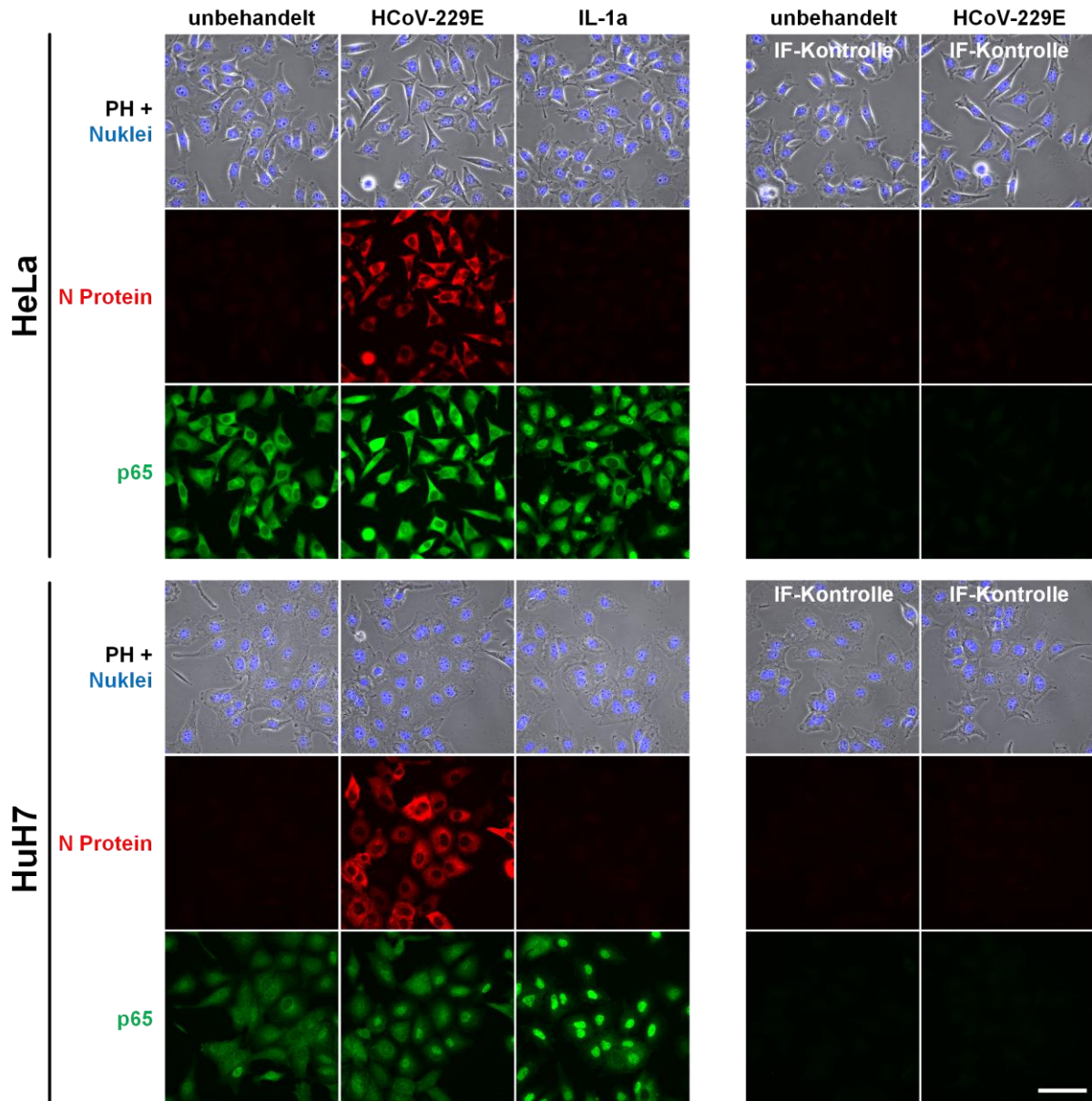


Abbildung 24: Validierung der Infektionseffizienz und der p65 Translokation in HuH7 und HeLa Zellen nach HCoV-229E Infektion oder IL-1a Stimulation. Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 24 h in Kultur gehalten, oder für 23 h in Kultur gehalten und anschließend für eine Stunde mit IL-1a stimuliert (10ng/μl), oder für 24 h nicht behandelt. Die Infektionseffizienz sowie die subzelluläre Verteilung von p65 wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung (IF) unter Verwendung von Antikörpern gegen das virale N Protein und p65 ermittelt. Die Infektionseffizienz lag in allen Experimenten bei annähernd 100%. Als IF-Kontrolle (ohne Primärantikörper) dienten sowohl unbehandelte, als auch für 24 h infizierte Zellen. Die Kernfärbung wurde mit Höchst durchgeführt. Maßstabsbalken = 100 μm. PH = Phasenkontrast (Poppe, Wittig et al. 2017)

Da gezeigt werden konnte, dass es in Folge einer HCoV-229E Infektion zu einer untypischen Aktivierung des NF- κ B Signalweges kommt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Expression der Faktoren p65 und TNFAIP3 relevant für die Virusreplikation und die Wirtszellantwort ist. Dafür wurde die Expression von p65 über RNAi fast vollständig reprimiert. Dies führte zu einer ebenfalls verminderten I κ B α Expression, da I κ B α ein typisches NF- κ B Zielgen darstellt (Ben-Neriah 2002). Nichtsdestotrotz konnte die verbliebene I κ B α Menge sowohl durch eine HCoV-229E Infektion, als auch durch eine IL-1 α Stimulation weiter abgesenkt werden. Außerdem konnte durch den p65 *knockdown* keine Veränderung der Translation des viralen N Proteins nachgewiesen werden (Abbildung 25A). Darüber hinaus wurde die Induktion der mRNA Expression verschiedener HCoV-229E und IL-1 α abhängiger Zielgene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die IL-1 α abhängige Induktion der Chemokine *IL8* und *CXCL2* durch einen p65 *knockdown* fast vollständig supprimiert werden kann, wohingegen die HCoV-229E abhängige Induktion beider Gene lediglich partiell supprimiert wird. Gleiches gilt für die Induktion der Gene *HERPUD1* und *DNAJB9*. Die HCoV-229E abhängige Expressionsinduktion des Genes *ANKRD1* wird durch den *knockdown* nicht beeinflusst, wohingegen es zu einer verstärkten *CHAC1* Induktion kommt. Darüber hinaus halbiert sich die nachweisbare Menge viraler RNA (Abbildung 25B), was mit einem messbar verringertem Virustiter einhergeht und im Widerspruch zur unveränderten Menge des translatierten N Proteins steht (Dissertation Sascha Wittig, AG Kracht)(Poppe, Wittig et al. 2017).

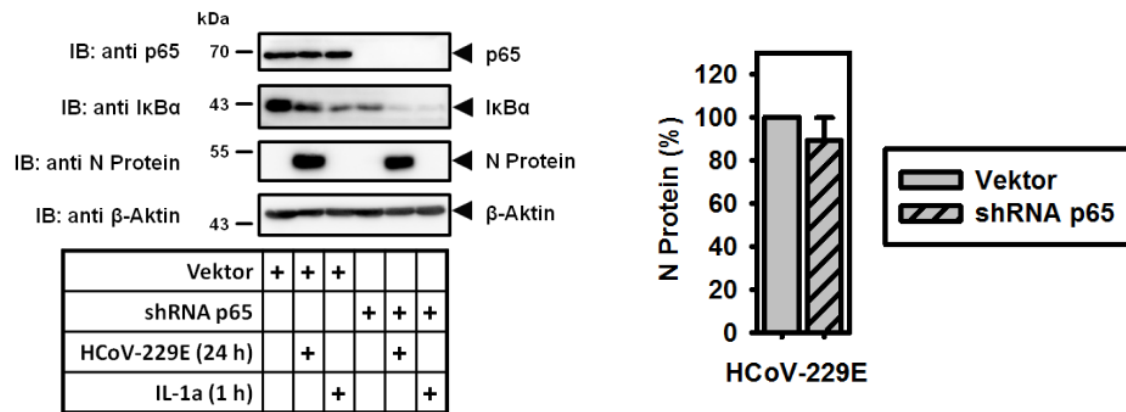
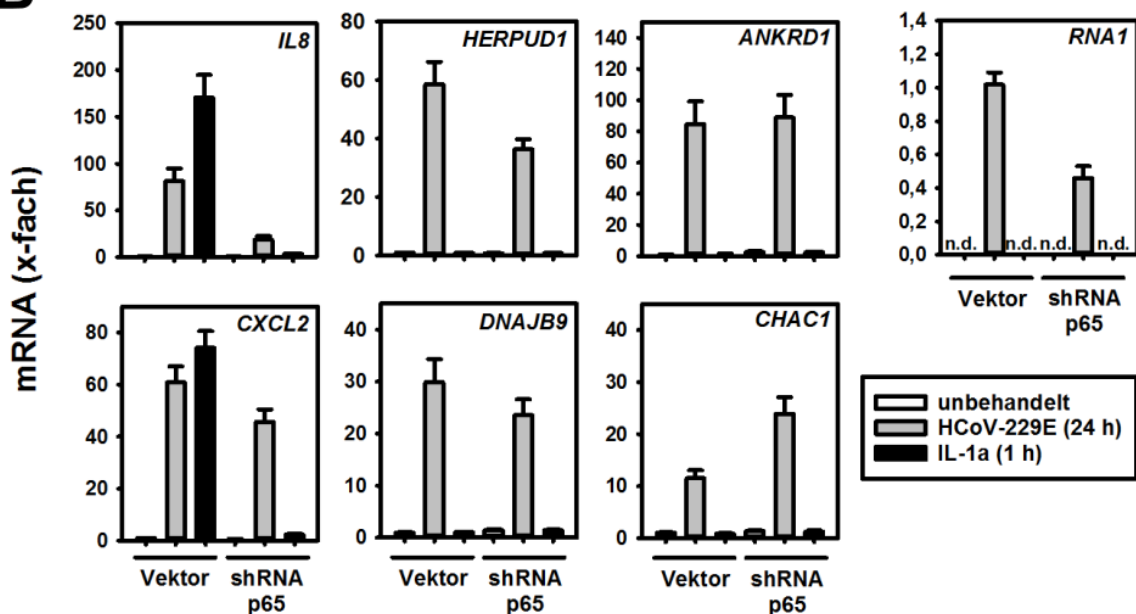
A**B**

Abbildung 25: Die shRNA vermittelte Suppression von p65 beeinflusst die virale Transkription sowie die transkriptionelle Regulation verschiedener HCoV-229E und IL-1a induzierter Wirtsgene. HeLa Zellen wurden in sechs unabhängigen Experimenten transient mit dem pSuper.puro Leervektor oder dem pSuper.puro shRNA p65 Vektor transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, bis sie sich vom Zellkulturgefäß ablösen und anschließend 1:7,5 in neue Zellkulturschalen geteilt und für weitere zwei Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) infiziert und für weitere 24 h in Kultur gehalten, oder für die gleiche Zeitspanne nicht behandelt, oder zunächst für 23 h nicht behandelt und dann eine Stunde vor der Ernte mit 10 ng/ml IL-1a stimuliert. (A) Aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) wurde die Expression der angegebenen Proteine per *western blot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der N Protein Menge erfolgte mit Hilfe der Software „Image Lab“. Gezeigt ist das prozentuale Verhältnis der N Protein Menge +/- s.e.m. relativ zur infizierten Vektorkontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (B) Die mRNA Expressionen von *IL8*, *CXCL2*, *HERPUD1*, *DNAJB9*, *ANKRD1*, *CHAC1* und des viralen RNA Abschnitts, der für das *NSP8* Protein kodiert (*RNA1*) wurden mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. von sechs (*IL8*, *CXCL2*, *ANKRD1*, *CHAC1*, *RNA1*) oder vier (*HERPUD1*, *DNAJB9*) unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Vektorkontrolle (Wirtsgene), oder zur infizierten Vektorkontrolle (*RNA1*). Zwei der sechs Experimente wurden von Sascha Wittig durchgeführt. n.d. = nicht detektierbar (Poppe, Wittig et al. 2017)

Die Relevanz von p65 für die HCoV-229E spezifische Wirtsantwort und Replikation wurde außerdem in einem CRISPR-Cas9 vermittelten *loss of function* Ansatz untersucht. Dafür wurden HeLa Zellen mit einem Plasmid stabil transfiziert, auf welchem die spezifische Sequenz der gegen p65 gerichteten *single guide* RNA codiert war (das Plasmid wurde von Tabea Riedlinger kloniert). Auch in diesen Zelllinien führt die Suppression von p65 zu einer Suppression von I κ B α . Nichtsdestotrotz führt die HCoV-229E Infektion, wie die IL-1 α Stimulation zu einer zusätzlichen Minderung der I κ B α Menge, wobei die Menge des translatierten N Proteins in infizierten Zellen nicht verändert ist. Der CRISPR-Cas9 vermittelte *knockdown* von p65 rekapituliert daher die Ergebnisse aus dem RNAi vermittelten *knockdown* (Abbildung 26). Auf Ebene der Wirtszellantwort ist dies für die Chemokine *IL8* und *CXCL2* ebenfalls der Fall. Die mRNA Expressionsinduktionen der Gene *ANKRD1* und *CHAC1* unterscheiden sich allerdings zwischen dem CRISPR-Cas9 und dem RNAi vermittelten *knockdown*. In den CRISPR-Cas9 Zellen kommt verglichen mit der Kontrolle zu einer vergleichbaren *CHAC1* Induktion, wohingegen die *ANKRD1* Induktion durch die p65 Suppression verstärkt wird. Die virale RNA Menge wird genau wie im RNAi Ansatz auf etwa die Hälfte vermindert (Abbildung 26).

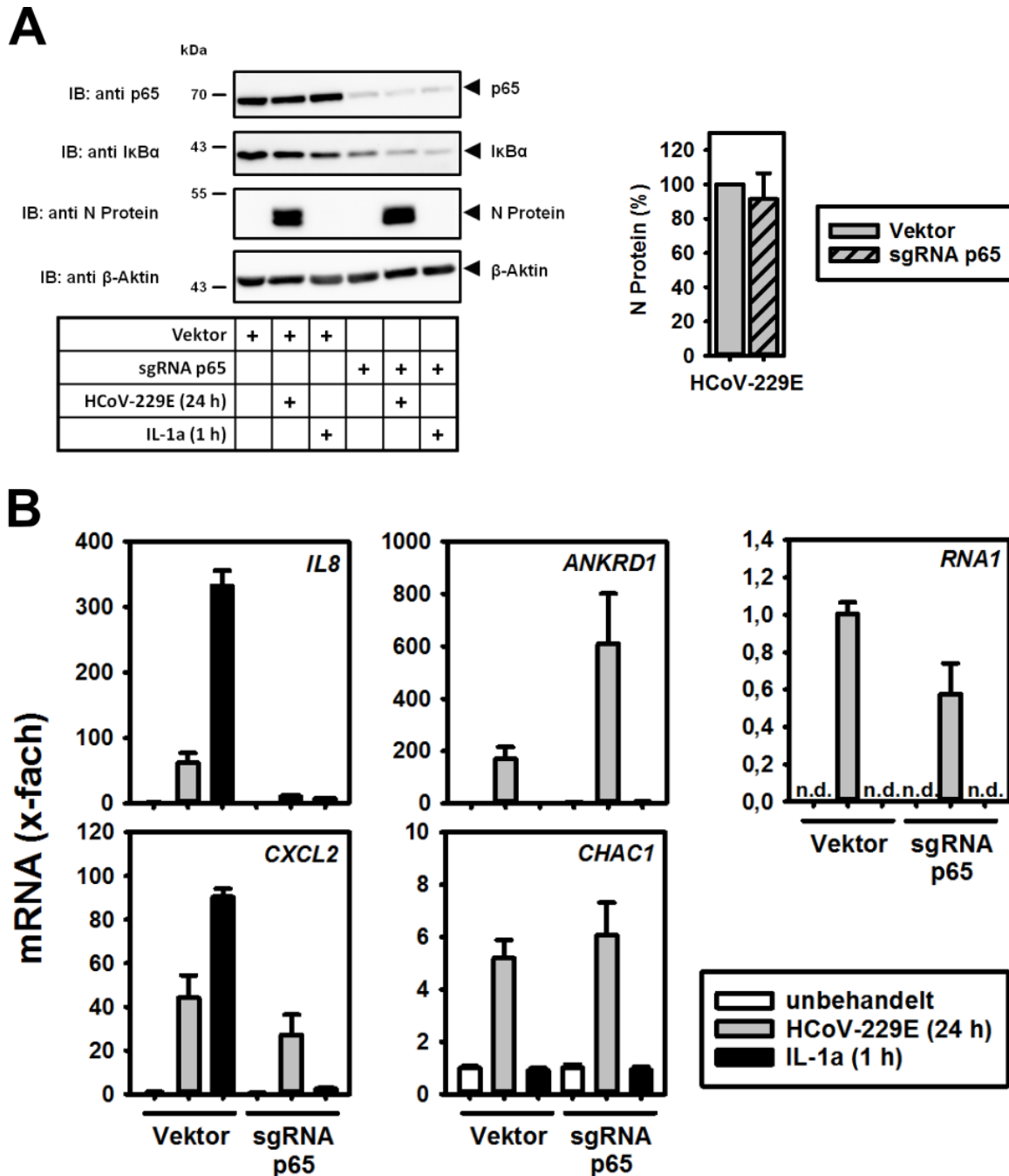


Abbildung 26: Die *single guide* RNA vermittelte Suppression von p65 beeinflusst ebenfalls die virale Transkription sowie die transkriptionelle Regulation verschiedener HCoV-229E und IL-1a induzierter Wirtsgene. HeLa Zellen, welche stabil mit dem pX459 Leervektor oder dem pX459 sgRNA p65 Vektor transfiziert wurden, wurden in drei unabhängigen Experimenten entweder mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) infiziert und für 24 h in Kultur gehalten, oder für die gleiche Zeitspanne nicht behandelt, oder zunächst für 23 h nicht behandelt und dann eine Stunde vor der Ernte mit 10 ng/ml IL-1a stimuliert. (A) Aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) wurde die Expression der angegebenen Proteine per *western blot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der N Protein Menge erfolgte mit Hilfe der Software „Image Lab“. Gezeigt ist das prozentuale Verhältnis der N Protein Menge +/- s.e.m. relativ zur infizierten Vektorkontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (B) Die mRNA Expressionen von *IL8*, *CXCL2*, *ANKRD1*, *CHAC1* und des viralen RNA Abschnitts, der für das *NSP8* Protein kodiert (*RNA1*) wurden mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. relativ zur unbehandelten Vektorkontrolle (Wirtsgene), oder zur infizierten Vektorkontrolle (*RNA1*). n.d. = nicht detektierbar

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Infektion mit HCoV-229E zu einer transkriptionellen und einer translationalen Induktion von TNFAIP3 führt, wurde dessen Funktion für die virale Replikation und Wirtszellantwort ebenfalls weiter charakterisiert (Abbildung 16, Abbildung 23B). Es zeigte sich, dass die RNAi abhängige Suppression die Translation des viralen N Proteins auf ca. 30% reduziert. Gleichzeitig wird die messbare virale RNA Menge auf 3% reduziert. Dies impliziert, dass TNFAIP3 einen hochgradig relevanten Faktor für die virale Replikation darstellt. Darüber hinaus zeigte die weitere Analyse, dass der TNFAIP3 knockdown die basale Expression verschiedener HCoV-229E und IL-1a abhängiger Zielgene induziert, wobei *IL8* und *ANKRD1* davon am stärksten betroffen waren. Für die Gene *CXCL2*, *CHAC1* und *DNAJB9* kam es zu einer moderaten Induktion, wohingegen die basale Expression von *HERPUD1* nicht betroffen war (Abbildung 27).

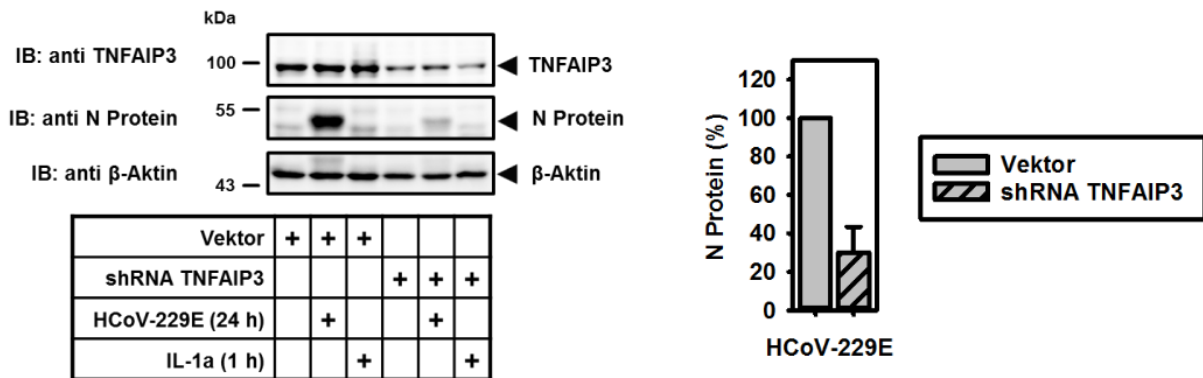
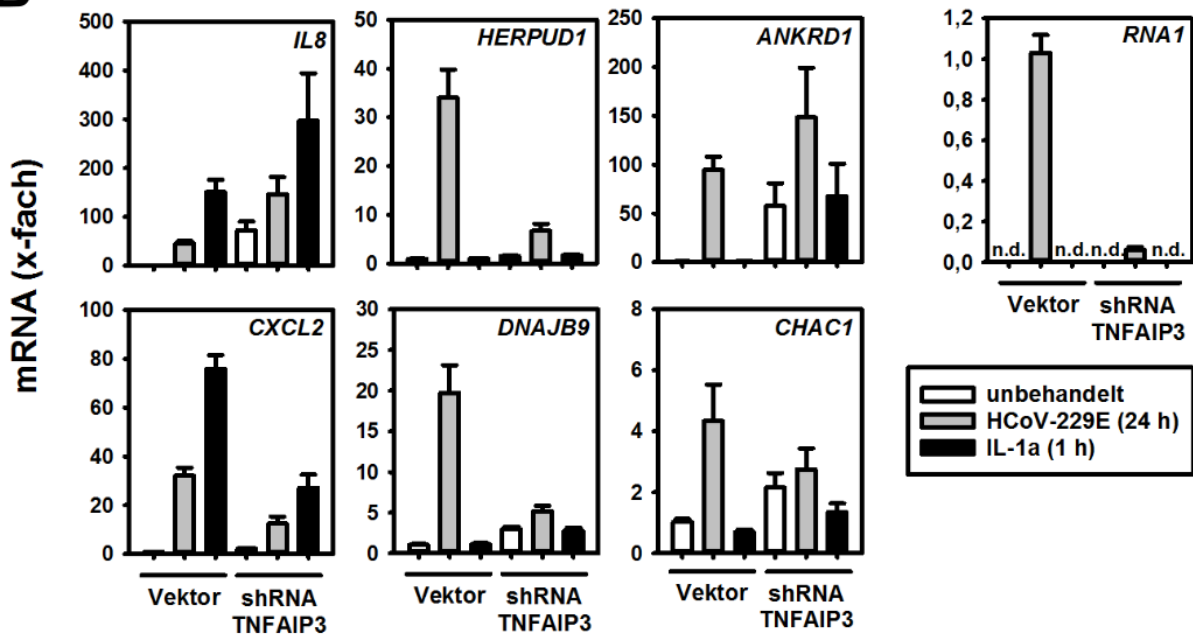
A**B**

Abbildung 27: Die shRNA vermittelte Suppression von TNFAIP3 beeinflusst die virale Replikation sowie die transkriptionelle Regulation verschiedener HCoV-229E und IL-1a induzierter Wirtsgene. HeLa Zellen wurden in fünf unabhängigen Experimenten transient mit dem pSuper.puro Leervektor, oder dem pLKO.1 shRNA TNFAIP3 Vektor transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, bis sie sich vom Zellkulturgefäß ablösen und anschließend 1:7,5 (pLKO.1 shRNA TNFAIP3) oder 1:15 (pSuper.puro Leervektor) in neue Zellkulturschalen geteilt und für weitere drei Tage mit 1 μ g/ml Puromycin selektiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) infiziert und für weitere 24 h in Kultur gehalten, oder für die gleiche Zeitspanne nicht behandelt, oder zunächst für 23 h nicht behandelt und im Anschluss eine Stunde vor der Ernte mit 10 ng/ml IL-1a stimuliert. (A) Aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) wurde die Expression von TNFAIP3 und des viralen N Proteins per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der N Protein Menge erfolgte mit Hilfe der Software „Image Lab“. Gezeigt ist das prozentuale Verhältnis der N Protein Menge \pm s.e.m. relativ zur infizierten Vektorkontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (B) Die mRNA-Expressionen von *IL8*, *CXCL2*, *HERPUD1*, *DNAJB9*, *ANKRD1*, *CHAC1* und des viralen RNA Abschnittes, der für das *NSP8*-Protein kodiert (*RNA1*) wurden mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression \pm s.e.m. relativ zur unbehandelten Vektorkontrolle (Wirtsgene), oder zur infizierten Vektorkontrolle (*RNA1*). n.d. = nicht detektierbar (Poppe, Wittig et al. 2017)

Zusammenfassend charakterisieren die in Kapitel 5.1 dargestellten Ergebnisse in zwei Zelllinien einen Satz an HCoV-229E spezifisch deregulierten Genen und definiert in einer tiefergehenden Analyse die dahinterstehenden zellulären Prozesse. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Wirtszellantwort auf infizierte Zellen beschränkt ist, da es zu keiner Genregulation in Zellen kommt, die sich in der gleichen Kultur befinden, aber nicht infiziert sind. Genau wie bei einer IL-1 α Stimulation kommt es durch die HCoV-229E Infektion zu einer Aktivierung proinflammatorischer Prozesse. Außerdem wird durch die HCoV-229E Infektion der ER Stress Signalweg aktiviert. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Faktoren aktiviert werden, die für die Polymerase II Promotorbindung essentiell sind und dass es zu einer negativen Regulation von Faktoren kommt, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen Atmungskette stehen. Die detailliertere Analyse HCoV-229E induzierter proinflammatorischer Prozesse offenbarte, dass die untersuchten Schritte der MAPK-Kaskaden Aktivierung durch HCoV-229E und IL-1 α qualitativ ähnlich ablaufen, wohingegen die virusabhängige Aktivierung des NF- κ B Signalweges untypisch verläuft. Suppressionsanalysen für die Proteine p65 und TNFAIP3 zeigten darüber hinaus, dass auch Komponenten des NF- κ B-Signalweges essentiell für eine erfolgreiche Replikation des HCoV-229E sind.

5.2 Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Wirtsantwort auf den Ebenen des Proteoms und der posttranslationalen Modifikationen.

Im ersten Kapitel dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf einer HCoV-229E Infektion zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges kommt. Dabei kommt es zu einer PERK abhängigen Phosphorylierung von EIF2 α an Serin 51 (Abbildung 23), was eine umfassende ribosomale Blockade der zellulären Translation zur Folge hat und bekanntermaßen von verschiedenen Coronaviren induziert wird (Raaben, Groot Koerkamp et al. 2007; Cruz, Sola et al. 2011; Liao, Fung et al. 2013). Obwohl in Kapitel 5.1 gezeigt werden konnte, dass die Translation der mRNAs verschiedener Wirtsgene von dieser Blockade nicht betroffen sind (ATF3, JUN, KLF6, TNFAIP3), wurde bisher nicht untersucht, wie sich die Proteinspiegel aller vorhandenen zellulären Proteine und die Regulationen derer posttranslationalen Modifikationen im Rahmen einer HCoV-229E Infektion verändern. Daher wurde in HuH7 Zellen eine markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (LC-MS/MS) durchgeführt. Die Analyse beschränkt sich auf die Infektionszeitpunkte 12 Stunden und 24 Stunden, da in Vorexperimenten bereits gezeigt werden konnte, dass deregulierte posttranslationale Modifikationen in relevanten Prozessen nach 24 Stunden akkumulieren (siehe Abbildung 23). Die markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung bietet den Vorteil, dass das Experiment ohne isotoptmarkierte Aminosäuren durchgeführt werden konnte. Um einen möglichst vollständigen Überblick über HCoV-229E spezifisch deregulierte Prozesse zu erhalten, wurden neben der

5 Ergebnisse

Proteomanalyse außerdem Anreicherungsprotokolle für phosphorylierte Aminosäuren (IMAC) und für acetylierte Aminosäuren (Immunpräzipitation) durchgeführt. Darüber hinaus wurden via Immunpräzipitation Peptide angereichert, die ein Diglycinüberrestmotiv am ϵ -C-Atom eines Lysins tragen. Diese Modifikation entsteht durch einem tryptischen Verdau, wenn das Lysin ubiquitiniert oder sumoyliert war. Ein schematischer Ablauf des Experimentes ist in Abbildung 28 dargestellt.

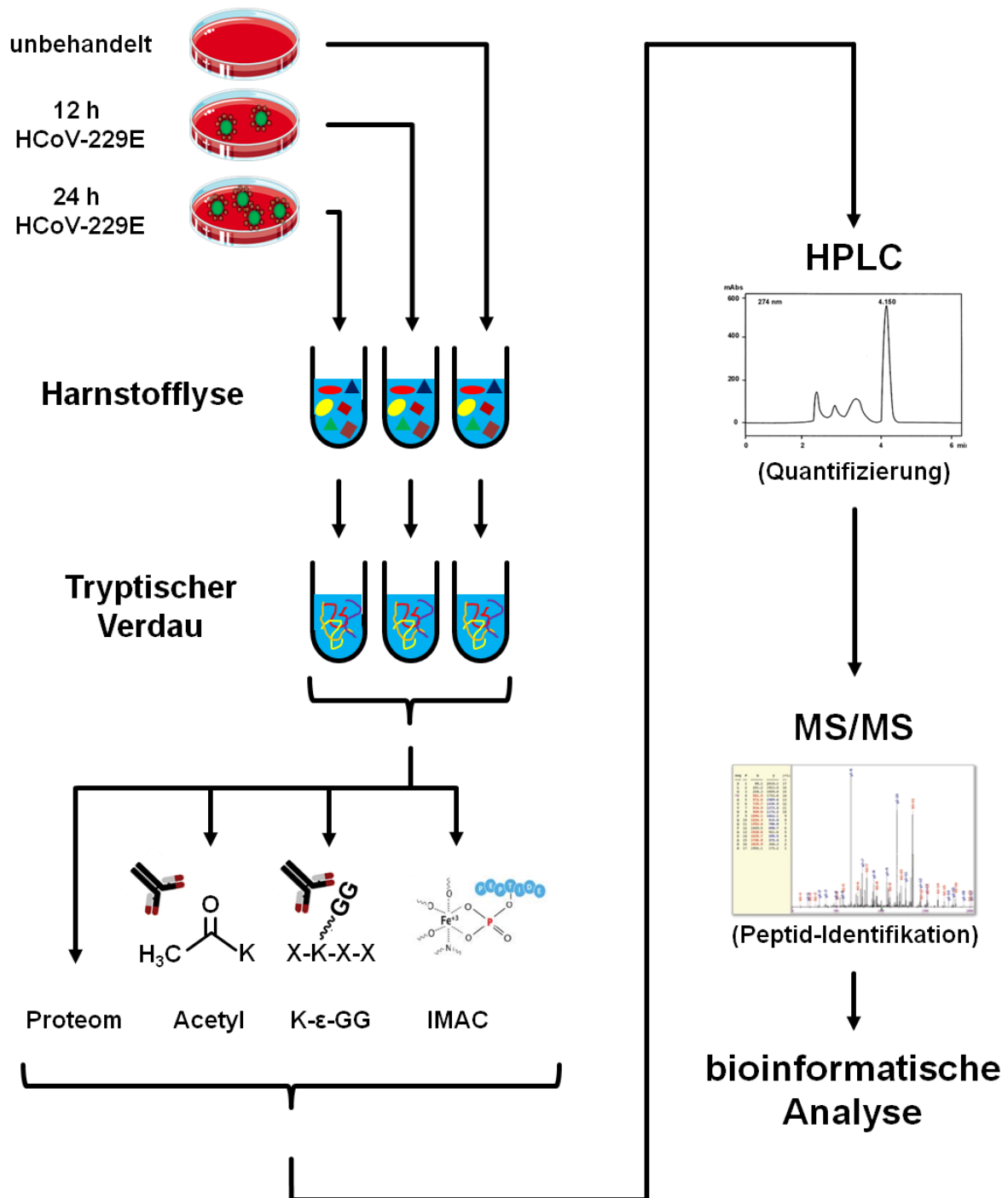


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Ablaufs einer markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung (LC-MS/MS) der Proteome von virusinfizierten Zellen. Für eine massenspektrometrische Analyse wird zunächst die gewünschte Zelllinie in Zellkulturschalen ausgesät (bei HuH7 Zellen $3,6 \times 10^7$ Zellen für 10 – 15 mg Ganzzelllysat pro Bedingung), um sie am nächsten Tag zu infizieren. Die Zellen werden anschließend geerntet und in Harnstofflysepuffer lysiert. Dies führt zu einer vollständigen Denaturierung der enthaltenen Proteine. Es folgt der tryptische Verdau (Trypsin spaltet an Arginin und Lysin C-terminal) der Proben, um die Proteine in kleinere Peptide aufzuspalten (wahlweise können auch weitere Proteasen wie: Pepsin, Chymotrypsin, LysC, LysN, AspN, GluC und ArgC verwendet werden)(Giansanti, Tsiatsiani et al. 2016). Anschließend werden die auf diese Weise erhaltenen Peptide direkt analysiert (Proteom), oder es werden vorher modifizierte Peptide angereichert. Es folgt die eigentliche Analyse der Peptide per

LC-MS/MS als technisches Duplikat (in diesem Experiment wurde ein LTQ-Orbitrap-Elite, ESI-CID SEQUEST System verwendet). Die resultierenden Daten werden bioinformatisch ausgewertet. K- ϵ -GG = Diglycin Überrestmotiv eines kovalent am ϵ -C-Atom eines Lysin gebundenen Ubiquitinrestes nach einem tryptischen Verdau; IMAC = *immobilized metal affinity column*; HPLC = *high pressure liquid chromatography*; MS = *mass spectrometry*

5.2.1 Analyse der PERK abhängigen Phosphorylierung des viralen N Proteins

Die Auswertung der markierungsfreien massenspektrometrischen Analyse wies nicht nur hunderte posttranslationale Modifikationen an zellulären Proteinen nach, sondern zeigte überraschenderweise auch auf, dass virale Proteine an einer Vielzahl von Aminosäuren Modifikationen tragen. Die meisten dieser Modifikationen konnten an viralen Strukturproteinen nachgewiesen werden, wobei vor allem das S Protein und das N Protein zu nennen sind. Während am S Protein hauptsächlich Ubiquitinreste nachgewiesen werden konnten, zeichnet sich das N Protein durch eine Vielzahl an Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinresten aus (Abbildung 29). Die generelle Struktur des N Proteins bestehend aus einer RNA-Bindedomäne, einer serinreichen Region und einer Dimerisierungsdomäne ist über alle Coronaviren konserviert. Dies gilt aber nicht für die Primärsequenz, die zwischen den Coronavirusspezies stark variieren kann (McBride, van Zyl et al. 2014). Die Auswertung der Daten zeigte, dass die nachgewiesenen Phosphorylierungen sich auf die serinreiche Region, sowie auf den C-Terminus konzentrieren. Für beide Domänen konnte gezeigt werden, dass sie relevant für die Multimerisierung von N Proteinen sind, wobei die serinreiche Region außerdem essentiell für die Replikation ist (Luo, Ye et al. 2005; Tylor, Andonov et al. 2009; McBride, van Zyl et al. 2014). Aufgrund dessen wurden spezifische Antikörper für die Bindung von phosphoryliertem Serin 145 und 149, beziehungsweise Serin 364 und 367 hergestellt (Abbildung 30A). Die Spezifität der Antikörper wurde anschließend über eine *in vitro* Dephosphorylierung mit *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) eines Ganzzellextraktes aus infizierten HuH7 Zellen durchgeführt. Dies validierte die Spezifität des Antikörpers für die Phosphorylierung an den Serinen 364 und 367, jedoch nicht die des Antikörpers für die Phosphorylierung an den Serinen 145 und 149. Da die Zellen für dieses Experiment in einem nicht denaturierenden Puffer lysiert wurden, ist es allerdings möglich, dass das entsprechende Epitop für die Phosphatase nicht zugänglich war, sodass die Antikörper dennoch spezifisch an die phosphorylierten Serine binden könnten (Abbildung 30B).

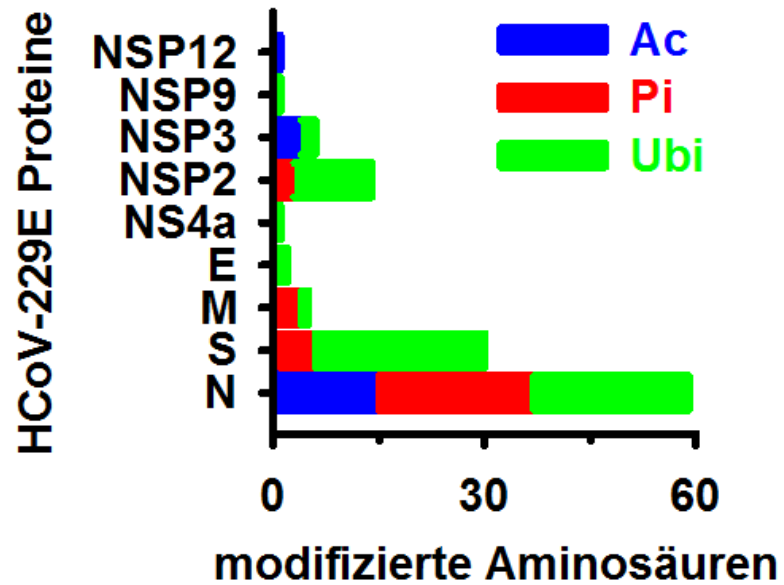


Abbildung 29: Die massenspektrometrische Analyse offenbarte eine Vielzahl von modifizierten Aminosäuren an viralen Proteinen. Zusammenfassung aller nachgewiesenen acetylierten, phosphorylierten und ubiquitinierten Aminosäuren an viralen Proteinen. Ac = Acetylierung an Lysin; Pi = Phosphorylierung an Threonin, Tyrosin oder Serin; Ubi = K-ε-GG Motiv an Lysin; E = *envelope*, M = *membrane*, N = *nucleocapsid*, S = *spike*

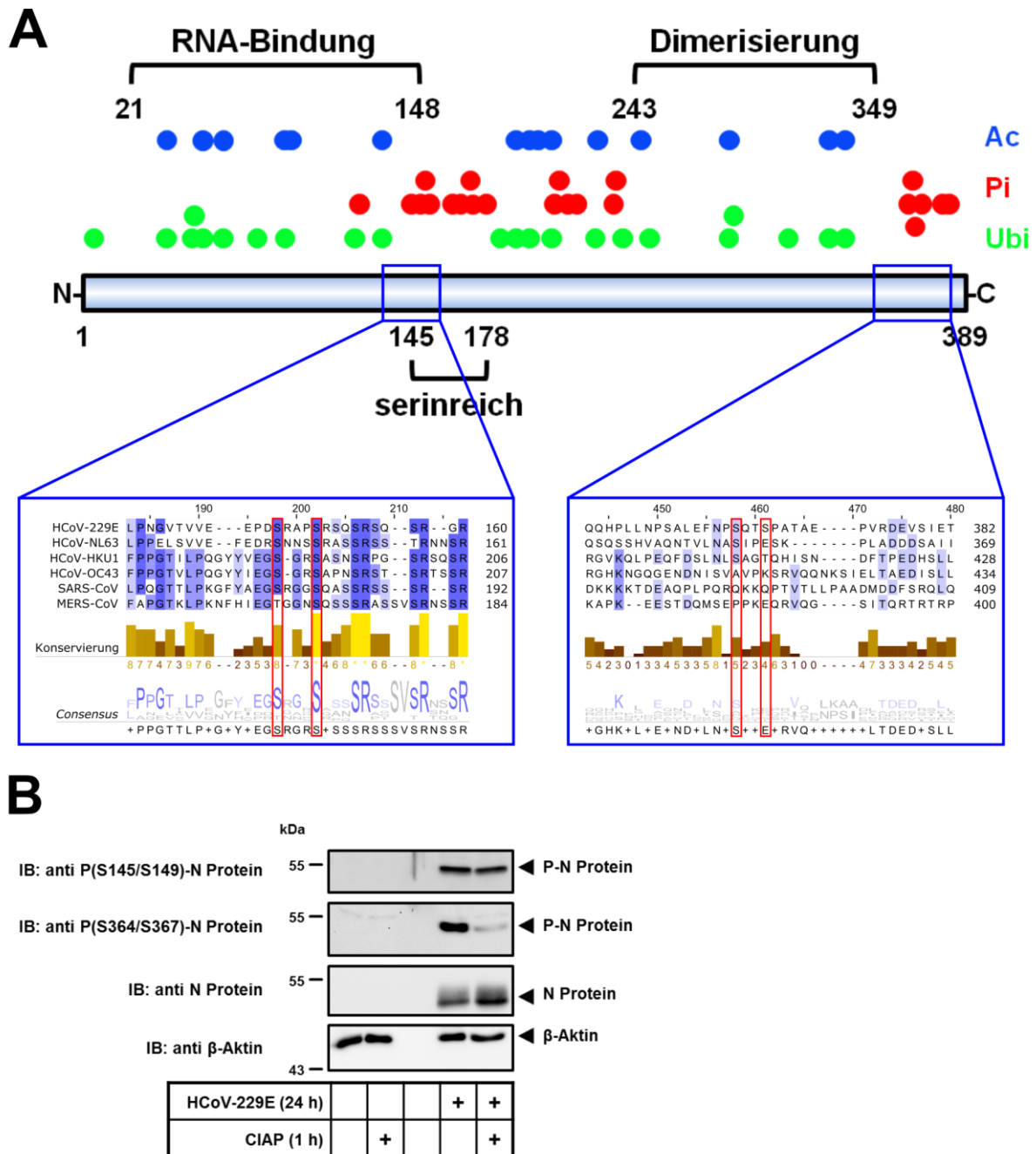


Abbildung 30: Phosphorylierungsspezifische Antikörpervalidierung für das virale N Protein an zwei Domänen mit unterschiedlichem Grad der Konservierung. (A) Der obere Teil der Abbildung zeigt die generellen Domänen des N Proteins aller Coronaviren am Beispiel von HCoV-229E (*UniProt* Datenbank). Im unteren Teil wurden die N Protein Sequenzen der sechs humanen Coronaviren HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV und MERS-CoV mit dem Programm JalView aligniert. Die zwei vergrößert dargestellten Bereiche enthalten die Aminosäuren, für welche phosphorylierungsspezifische Antikörper hergestellt wurden (rot eingerahmt unterer Teil). Ac = Acetylierung an Lysin; Pi = Phosphorylierung an Threonin, Tyrosin oder Serin; Ubi = K- ϵ -GG Motiv an Lysin (B) HuH7 Zellen wurden nach der Infektion (MOI = 1) für 24 h in Kultur gehalten oder nicht behandelt. Die Zellen wurden in nicht denaturierendem NET1 Puffer (ohne EDTA) lysiert, um die Ganzzelllysate anschließend für eine Stunde bei 37°C mit *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) zu dephosphorylieren. Die Expression und Phosphorylierung des N Proteins wurde anschließend per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin dient als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot

Einer der Kernbefunde aus Kapitel 5.1 ist, dass die Infektion mit HCoV-229E zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges in den Wirtszellen führt, wobei die PERK abhängige Aktivierung auch experimentell bestätigt wurde (Abbildung 23). Aus diesem Grund wurde analysiert, ob eine inhibitorbasierte Hemmung von PERK mit dem spezifischen Inhibitor GSK 2606414 (Axten, Medina et al. 2012) die Virusreplikation und die Phosphorylierung des N Proteins beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die PERK Inhibition die HCoV-229E spezifische Induktion der Phosphorylierungen von JNK und p38 hemmt. Darüber hinaus kommt es vor allem bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM zu einer deutlichen Hemmung der ATF3 Translation, was die Spezifität des Inhibitors validiert, da die ATF3 Expression distal von einer PERK Aktivierung induziert wird (Gong, Wang et al. 2017). Weiterhin zeigte das Experiment, dass die Translation des N Proteins nur schwach gehemmt wird, wohingegen es zu einer starken Hemmung der N Protein Phosphorylierung an Serin 364 und 367 kommt (Abbildung 31).

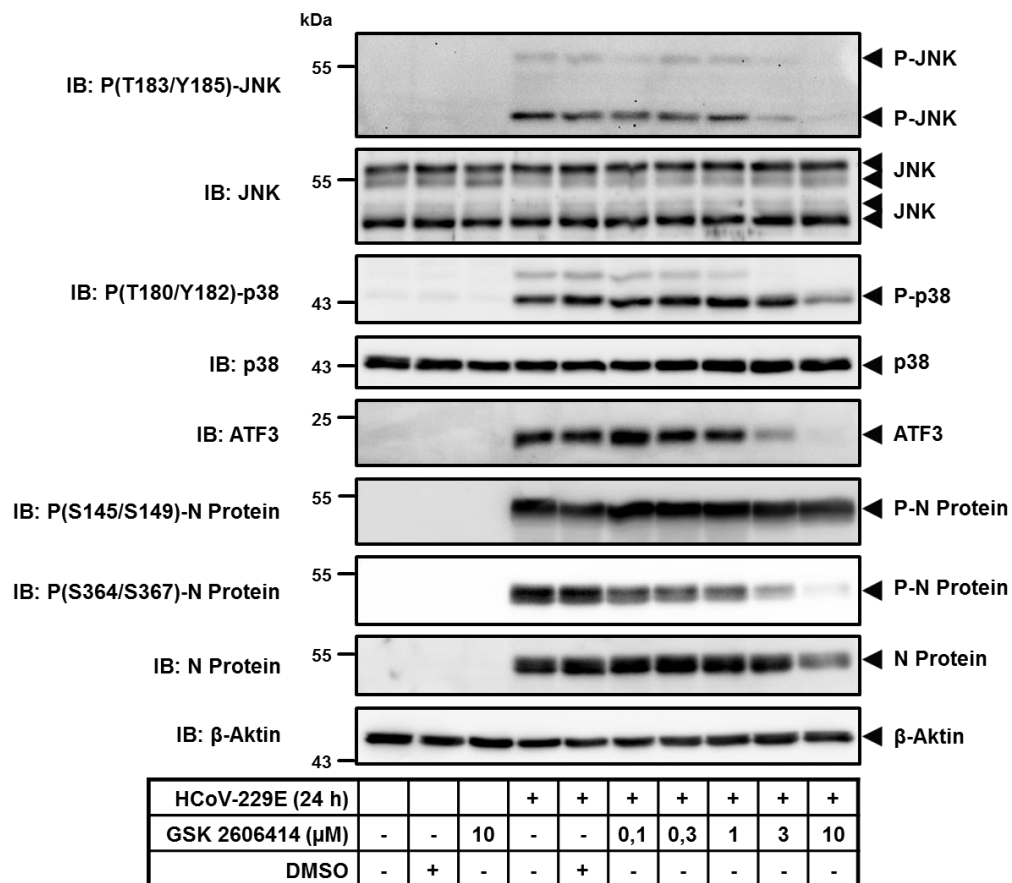


Abbildung 31: Die inhibitorbasierte Hemmung des HCoV-229E induzierten PERK abhängigen ER Stress Signalweges führt zu einer schwächeren Phosphorylierung des viralen N Proteins im C-Terminus. HuH7 Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten für eine Stunde mit dem PERK Inhibitor GSK 2606414 in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO vorbehandelt und anschließend nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 24 h in Kultur gehalten. Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) per *western blot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin dient als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde untersucht, ob eine spezifische inhibitorbasierte Hemmung von p38 und JNK ebenfalls die Phosphorylierung des N Proteins am C-Terminus beeinflusst. Es zeigte sich, dass die Hemmung von p38 zu einer verstärkten HCoV-229E spezifisch induzierten Phosphorylierung von JNK und des C-Terminus des N Proteins führt. Darüber hinaus kommt es durch die Hemmung von JNK zu einer verringerten Translation und Phosphorylierung des N Proteins. Sowohl durch die PERK als auch durch die JNK Hemmung konnten außerdem verringerte Titer gemessen werden, wohingegen eine p38 Hemmung den Titer nicht beeinflusst (Abbildung 32).

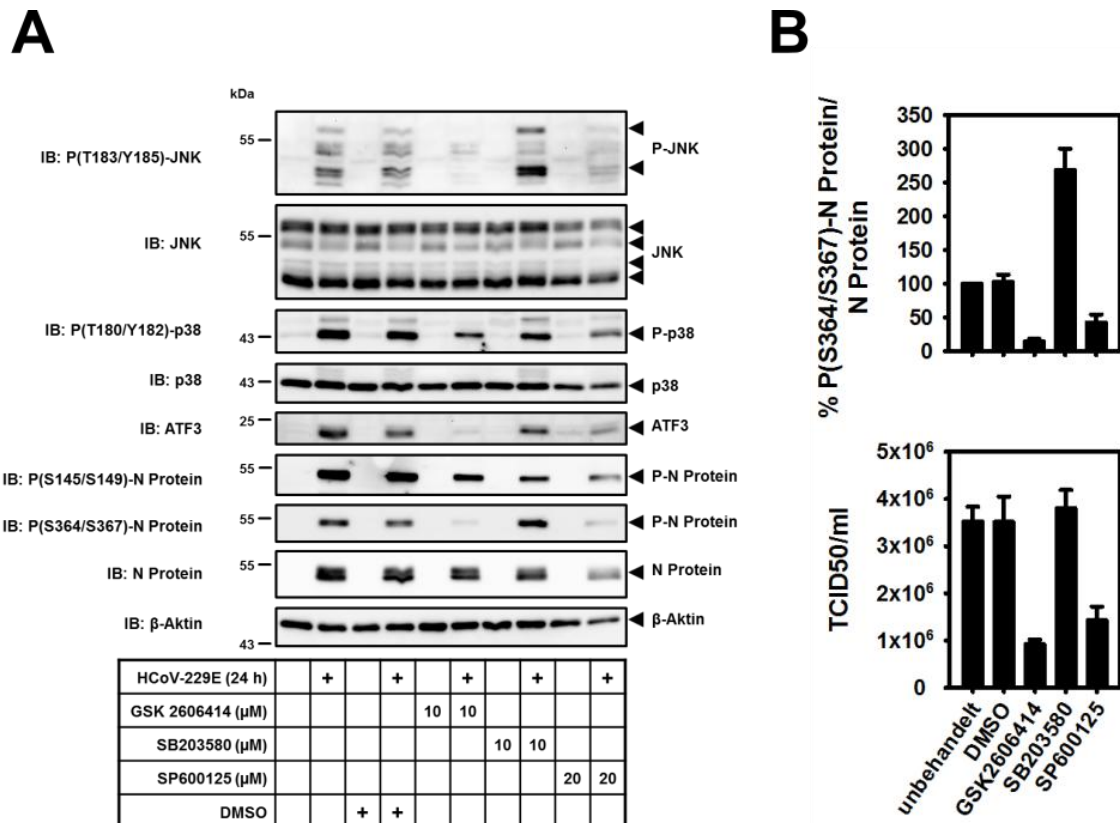


Abbildung 32: Die inhibitorbasierte Hemmung der HCoV-229E induzierten Kinasen PERK, JNK und p38 führt zu einer veränderten Phosphorylierung des viralen N-Proteins im C-Terminus, sowie einer verringerten viralen Replikation. (A) HuH7 Zellen wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten für eine Stunde mit dem PERK Inhibitor GSK 2606414, dem p38 Inhibitor SB203580 oder dem JNK Inhibitor SP600125 in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO vorbehandelt und anschließend nach der Infektion (MOI = 1) für 24 h in Kultur gehalten. Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) per *western blot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin dient als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (B) Die Quantifizierung der N Protein und der P(S364/S367)-N Protein Menge erfolgte mit Hilfe der Software „Image Lab“. Die Titerbestimmung erfolgte mittels TCID₅₀ assay und wurde in jedem Experiment als technisches Triplikat durchgeführt: unbehandelt, DMSO und GSK2606414 n = 5, SB203580 n = 3, SP600125 n = 4.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Proteine des HCoV-229E im Verlauf der Infektion an einer Reihe von Aminosäuren posttranslational modifiziert werden. Vor allem das Ausmaß der Modifikationen war dabei überraschend, da dies bisher für kein Coronavirus beschrieben wurde. Da bisher für kein Coronavirusprotein eine Kinaseaktivität beschrieben wurde, wurden drei Wirtskinasen mit Inhibitoren gehemmt, um den Effekt auf zwei C-Terminale Phosphorylierungen des viralen N Proteins zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Inhibition jeder Kinase zu einem veränderten Phosphorylierungslevel an den zwei Serinen führt, was impliziert, dass diese Aminosäuren tatsächlich primär durch Wirtskinasen und Wirtsphosphatasen modifiziert werden.

5.2.2 Die Charakterisierung der HCoV-229E induzierten Proteinveränderungen über markierungsfreie Massenspektrometrie offenbart eine Vielzahl an bisher unbekannten HCoV-229E spezifisch deregulierten Prozessen.

Die globale Auswertung des Experimentes zeigte, dass auf der Ebene des Proteoms 27781 Peptide, sowie 2480 acetylierte -, 5477 phosphorylierte - und 5077 ubiquitinierte Peptide identifiziert werden konnten. Die Anzahl an Peptiden, die sowohl in modifizierter als auch in nicht modifizierter Form nachgewiesen werden konnten, war dabei verhältnismäßig gering, sodass eine Normierung der modifizierten Peptide anhand der nicht modifizierten Peptide nicht möglich war (Abbildung 33A). Eine bioinformatische Analyse von massenspektrometrische Datensätzen unter Verwendung von Protein IDs, stellt für die wissenschaftliche Gemeinschaft bis heute eine Herausforderung dar (Schmidt, Forne et al. 2014). Für eine Auswertung über ORA wurden deswegen die Protein IDs in die zugehörigen Gene IDs (Entrez) umgewandelt, was die Komplexität des Datensatzes verringert. Auf Basis der Gene ID konnten insgesamt 3545 Proteine nachgewiesen werden, sowie 1246 acetylierte -, 2610 phosphorylierte - und 2127 ubiquitinierte Proteine. Obwohl ein großer Teil der modifizierten Proteine auch auf der Ebene des Proteoms nachgewiesen werden konnten, gibt es insgesamt 2778 Proteine, die ausschließlich über modifizierte Peptide nachgewiesen wurden (Abbildung 33B). Da bereits eigene Daten zu virusinduzierten Phosphorylierungen vorlagen (Abbildung 23), konnten die Ergebnisse der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung in Teilen direkt überprüft werden. Die Analyse ergab, dass die Induktion der p38 Phosphorylierung an Threonin 180 und Tyrosin 182, wie sie bereits per *westernblot* nachgewiesen wurde, auch massenspektrometrisch erfasst wurde. Gleiches gilt für die JIP4 Phosphorylierung an Threonin 217, und die translationale Induktion des Transkriptionsfaktors JUN. Auch wenn per *westernblot* eine JUN Phosphorylierung an Serin 73 gezeigt werden konnte, wurde massenspektrometrisch kein Peptid erfasst, welches diese Aminosäure enthält. Es konnte allerdings ein induziertes Peptid nachgewiesen werden, welches an den Serinen 58 und 63 phosphoryliert war. Da die Induktion dieses phosphorylierten Peptides höher war, als der Anstieg der Proteinabundanz, rekapituliert dies sowohl die translationale als auch die

phosphorylierungsabhängige Aktivierung von JUN (Abbildung 33). Die JUN Phosphorylierungen an den Serinen 63 und 73 in der N-Terminalen Aktivierungsdomäne werden normalerweise ko-reguliert (Pulverer, Kyriakis et al. 1991; Morton, Davis et al. 2003).

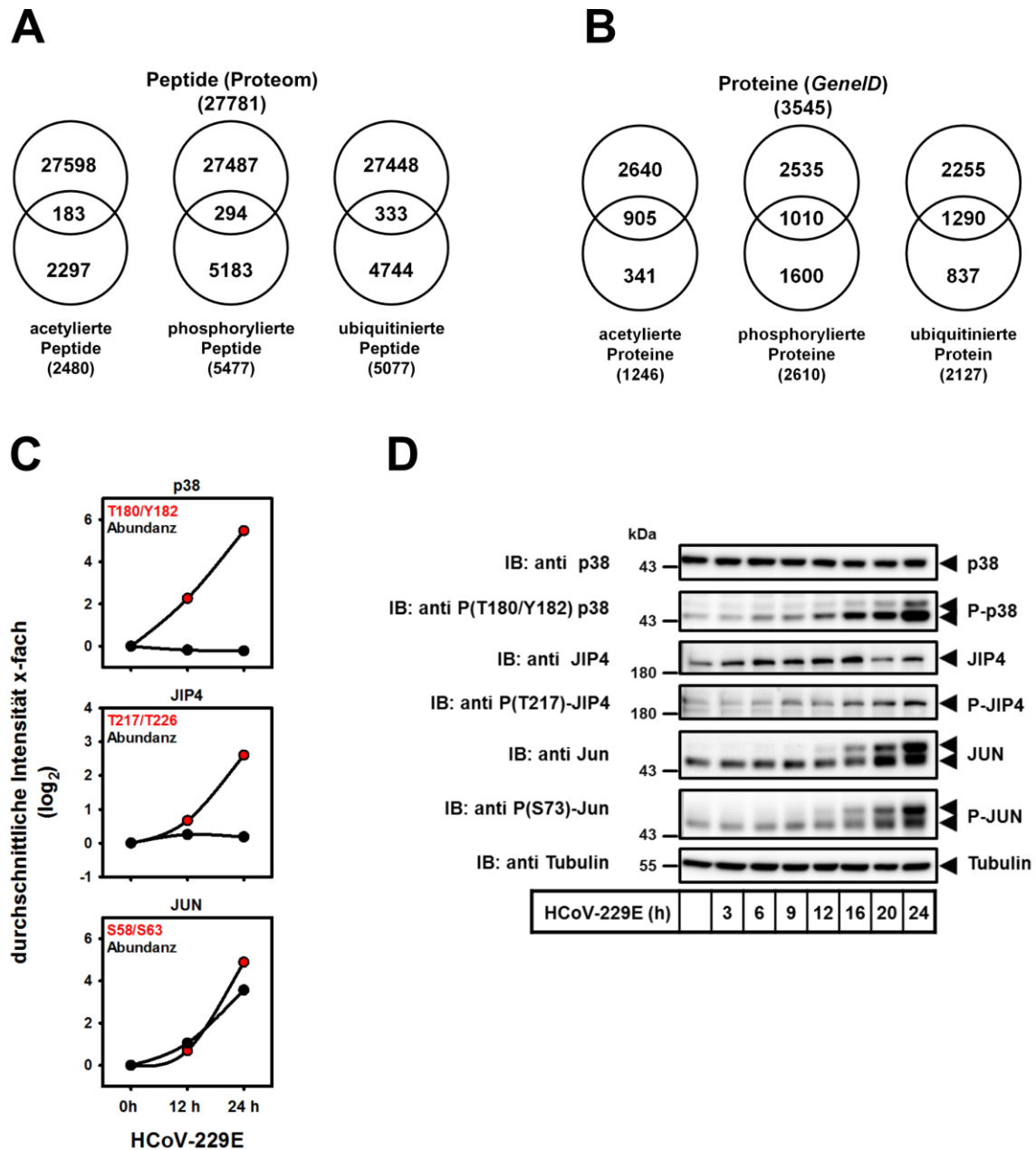


Abbildung 33: Die proteomweite Identifizierung von posttranslational modifizierten und unmodifizierten Peptiden in HCoV-229E infizierten HuH7 Zellen bestätigt die ursprünglichen westernblot Ergebnisse. (A) Zusammenfassung aller nachgewiesenen acetylierten, phosphorylierten, ubiquitinierten und unmodifizierten Peptide. (B) Zusammenfassung der nachgewiesenen Wirtspoteine auf Basis der zugehörigen GeneID. (C) Für die Proteine p38, JIP4 und JUN wurden die gemessenen Gesamtintensitätswerte der nachgewiesenen Peptide als Proteinabundanz über den Zeitverlauf geplottet. Außerdem wurde für jedes Protein die gemessene Intensität eines Peptides geplottet, bei welchem die in rot angegebenen Aminosäuren phosphoryliert waren. (D) Ausschnitt aus Abbildung 23, der zum Vergleich auf die in (C) dargestellten Proteine und Tubulin reduziert wurde. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot

Um auf Basis des Datensatzes Prozesse zu identifizieren, die für die HCoV-229E Replikation relevant sind, wurden die Daten wie im Methodenteil beschrieben über Qualitätsmerkmale gefiltert. Anschließend wurden regulierte Proteine anhand eines Schwellenwertes (1-fach (\log_2 transformiert)) sowohl für den 12 - als auch für den 24 Stunden Zeitpunkt isoliert. Die Analyse zeigte, dass insgesamt 187 Proteine eine veränderte Abundanz aufweisen, wobei der Großteil zum 24 Stunden Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber stehen 73 Proteine mit deregulierten Acetylierungen, 1043 Proteine mit deregulierten Phosphorylierungen und 667 Proteine mit deregulierten Ubiquitinierungen, wobei der Großteil der deregulierten Phosphorylierungen nach 24 Stunden - und der Großteil der deregulierten Acetylierungen und Ubiquitinierungen nach 12 Stunden nachgewiesen werden konnte (Abbildung 34A). Der auf diese Weise determinierte Satz an deregulierten Proteinen, wurde für eine ORA gegen die KEGG Signalweg -, sowie die GO Datenbank verwendet, wobei die Datensätze für die posttranslationalen Modifikationen gemeinsam ausgewertet wurden. Anhand der Analyse wird ersichtlich, dass der Großteil der mit deregulierten Proteinen angereicherten Signalwege und Kategorien durch posttranslationale Modifikationen bestimmt wird. Änderungen in der Proteinabundanz scheinen demgegenüber zumindest in diesem Experiment eine untergeordnete Rolle zu spielen (Abbildung 34B).

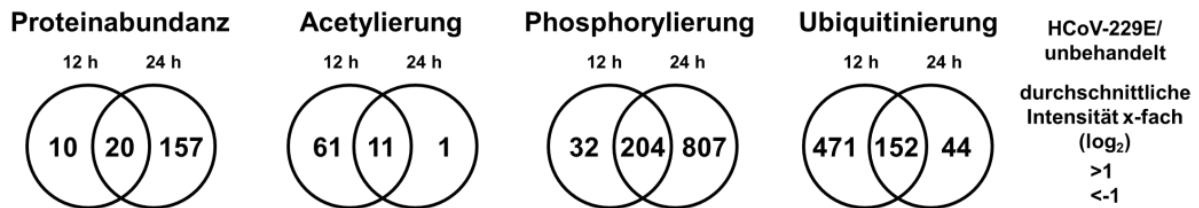
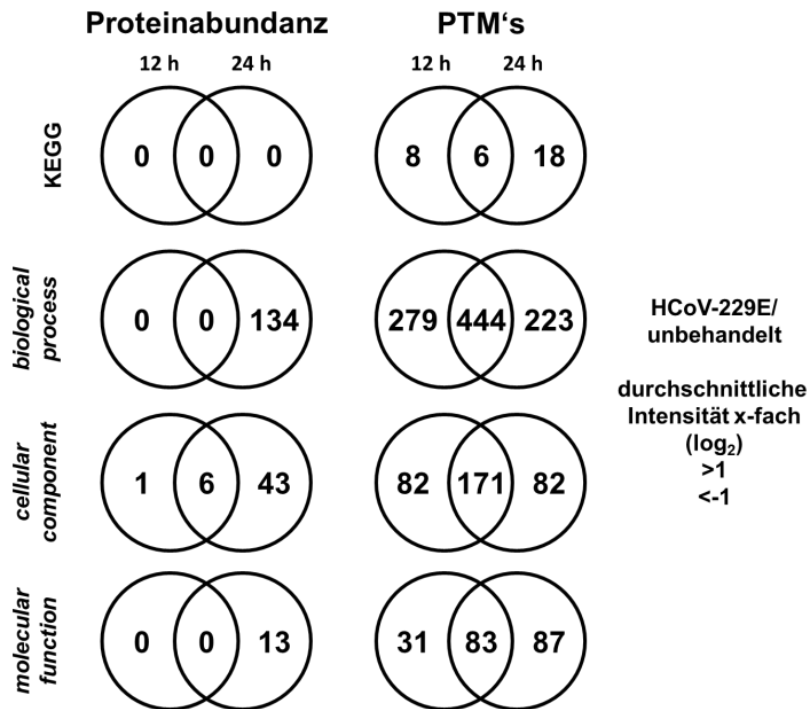
A**B**

Abbildung 34: Die identifizierten HCoV-229E regulierten posttranslational modifizierten- und unmodifizierten Proteine zeigen eine signifikante Anreicherung für KEGG Signalwege und für GO Kategorien aller drei Klassen. (A) Zusammenfassung aller nachgewiesenen acetylierten, phosphorylierten, ubiquitinierten und unmodifizierten Wirtsproteine (Auf Basis der *GeneID*), die eine Deregulation von mindestens 1-fach (log₂) aufweisen. **(B)** Mit dem in (A) determinierten Datensatz wurde mit Hilfe des *onlinetools* „Webgestalt“ (Zhang, Kirov et al. 2005) eine Anreicherungsanalyse für KEGG Signalwege und GO Kategorien durchgeführt, wobei die Gene, die regulierte posttranslationale Modifikationen trugen, vereinigt wurden (*overrepresentation enrichment analysis* (ORA) gegen das humane Genom beschränkt auf Signalwege/Kategorien mit 5 bis 2000 Genen; *false discovery rate* (FDR) < 0,05 (Benjamini Hochberg korrigiert)). Dargestellt sind alle zu beiden Zeitpunkten mit deregulierten Genen (Abundanz oder posttranslationale Modifikation (PTM)) angereicherten Signalwege/Kategorien.

Aufgrund der Fülle an nachgewiesenen KEGG Signalwegen und GO Kategorien, die mit deregulierten posttranslationalen Modifikationen angereichert sind, wurde darauf verzichtet, diese in einer detaillierteren Weise darzustellen. Stattdessen werden im Folgenden die Veränderungen einzelner angereicherter GO Kategorien netzwerkbasiert dargestellt.

Sowohl zum 12 Stunden -, als auch zum 24 Stunden Zeitpunkt kommt es zu einer Akkumulation deregulierter posttranslationaler Modifikationen aller untersuchten Formen an der Kernpore, wobei sich der Großteil der nachgewiesenen Modifikationen auf die Domänen des inneren Rings, des äußeren Rings und des nukleären Korbes konzentrieren (Abbildung 35). Für beide Zeitpunkte konnte außerdem eine Anreicherung von deregulierten posttranslationalen Modifikationen an Proteinen nachgewiesen werden, die der GO Kategorie *positive replication of viral genome replication* (GO:0045070) zugeordnet werden. Dies stellt einen direkten Nachweis der Qualität des Experimentes dar, da es im Rahmen der Erwartungen liegt, dass die HCoV-229E Infektion Proteine beeinflusst, von denen bereits gezeigt werden konnte, dass sie während viraler Infektionen eine Rolle spielen.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass es durch die HCoV-229E Infektion zu Regulationen an Proteinen kommt, die in direktem Zusammenhang mit der Ubiquitinierung von Histonen stehen, was wiederum sehr wahrscheinlich mit Veränderungen am Chromatin einhergeht. Aus diesem Grund wurden überprüft, ob im Ubiquitindatensatz Histonpeptide identifiziert werden konnten, die deregulierte Ubiquitinreste tragen. Dies war für 34 Peptide der Fall, wobei jede denkbare Kombination der Deregulation über den Zeitverlauf vertreten war (Abbildung 36).

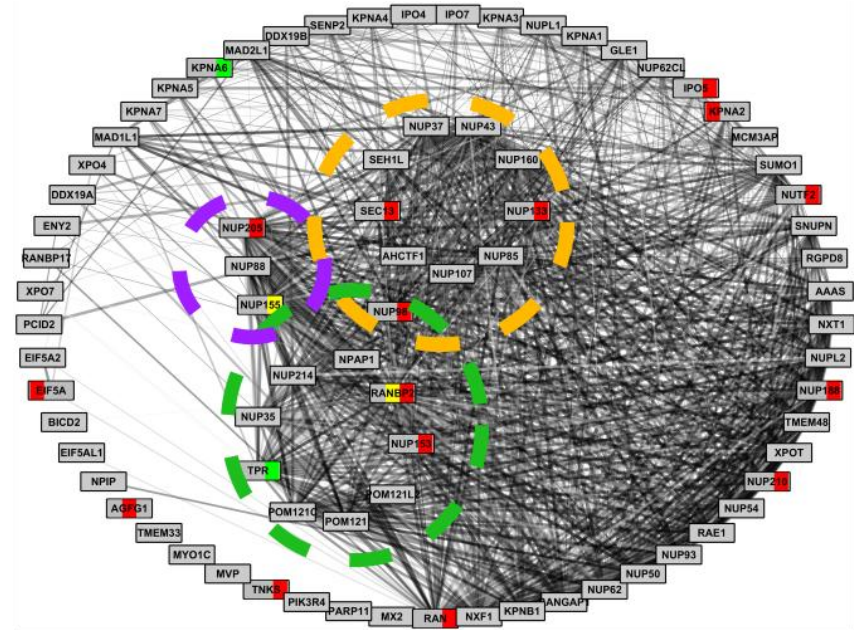
5 Ergebnisse

nuclear pore
 12 h
 GO:0005643
 FDR < 0,001
 n = 80

nuclear pore nuclear basket
 12 h
 GO:0044615
 FDR = 0,007
 n = 10

nuclear pore inner ring
 12 h
 GO:0044611
 n = 3

nuclear pore nuclear outer ring
 12 h
 GO:0031080
 FDR = 0,048
 n = 10

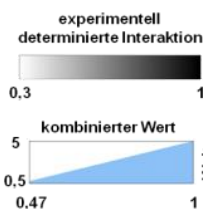
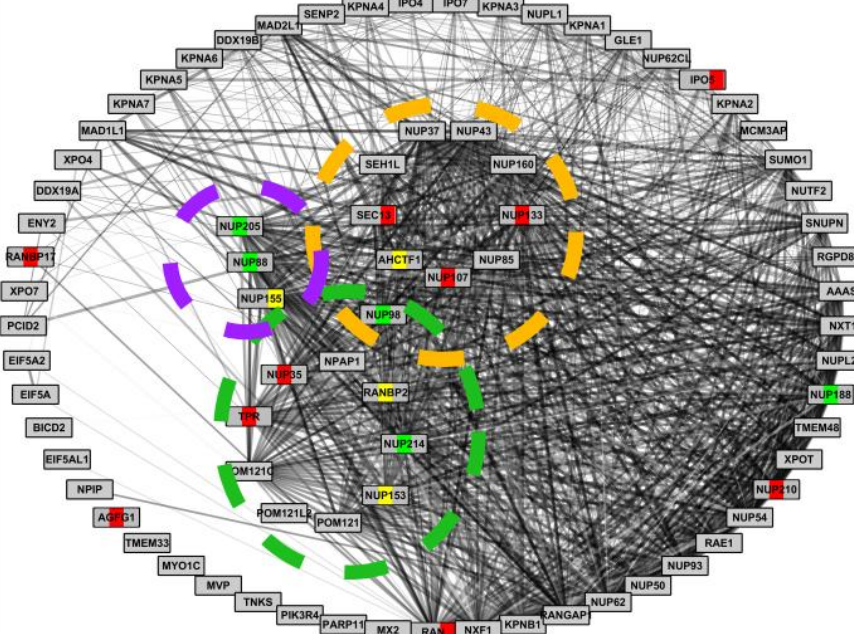


nuclear pore
 24 h
 GO:0005643
 FDR < 0,001
 n = 80

nuclear pore nuclear basket
 24 h
 GO:0044615
 FDR < 0,001
 n = 10

nuclear pore inner ring
 24 h
 GO:0044611
 n = 3

nuclear pore nuclear outer ring
 24 h
 GO:0031080
 FDR = 0,002
 n = 10



Ac Pi Ubi

induziert
 gemischte Regulation
 reprimiert

Abbildung 35: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorie *nuclear pore*. Für die Erstellung der Netzwerke wurden die zu den jeweiligen GO Kategorien gehörenden Proteine aus der „AmiGO 2“ Datenbank extrahiert und anschließend in das *string onlinetool* geladen, um die zugehörigen Interaktionsdaten zu isolieren. Das dadurch entstandene Netzwerk wurde mit „Cytoscape“ visualisiert, wobei der Schwärzungsgrad der Interaktion angibt, wie stark sie experimentell belegt ist und die Dicke die Höhe des kombinierten Interaktionswertes repräsentiert (berechnet aus den Werten für Homologie, Co-Expression, *texmining*, Datenbank

5 Ergebnisse

Informationen, Gennachbarschaft und Genfusion). Jeder Knoten repräsentiert ein Protein, wobei die Art der posttranslationalen Modifikation und die zugehörige Regulationsrichtung dem angegebenen Farbschema folgen. Außerdem wurden die drei „*childcompartments*“ *nuclear pore outer ring*, *nuclear pore inner ring* und *nuclear pore nuclear basket* gesondert markiert. FDR = *false discovery rate*

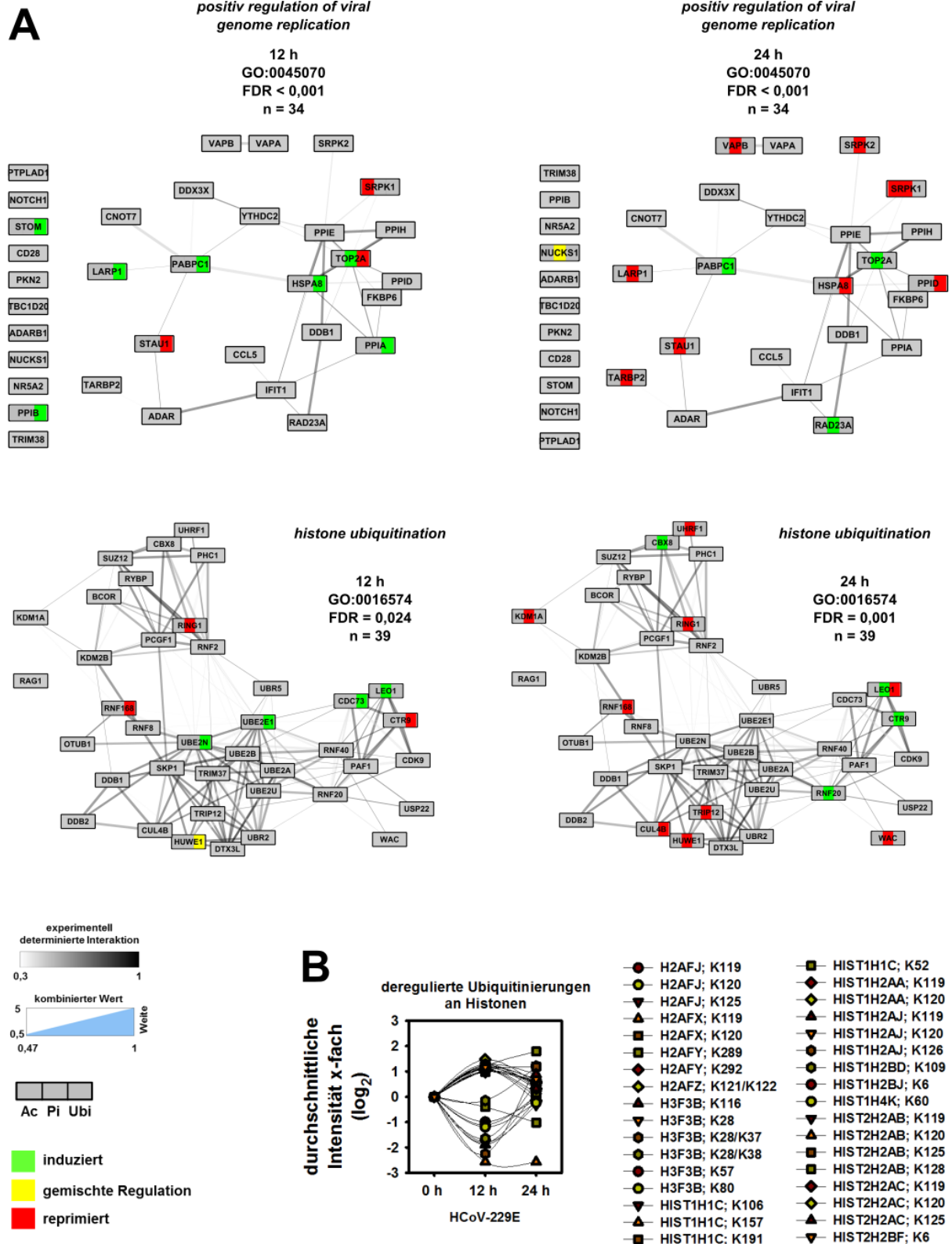


Abbildung 36: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorien *positiv regulation of viral genome replication* und *histone ubiquitination*. (A) Für die Erstellung der Netzwerke wurden die zu den jeweiligen GO Kategorien gehörenden Proteine aus der „AmiGO 2“ Datenbank extrahiert und anschließend in das *string onlinetool* geladen, um die zugehörigen Interaktionsdaten zu isolieren. Das dadurch entstandene Netzwerk wurde mit „Cytoscape“ visualisiert, wobei der Schwärzungsgrad der Interaktion angibt, wie stark sie experimentell belegt ist und die Dicke die Höhe des kombinierten Interaktionswertes repräsentiert (berechnet aus den Werten für

5 Ergebnisse

Homologie, Co-Expression, *texmining*, Datenbank Informationen, Gennachbarschaft und Genfusion). Jeder Knoten repräsentiert ein Protein, wobei die Art der posttranslationalen Modifikation und die zugehörige Regulationsrichtung dem angegebenen Farbschema folgen. **(B)** Für alle gemessenen deregulierten Histon Ubiquitinierungen wurden die zugehörigen Intensitätswerte über den Zeitverlauf geplottet.

Die weitere Analyse zeigte, dass es nicht nur zu einer Anreicherung von deregulierten posttranslationalen Modifikationen an Proteinen kommt, die in Zusammenhang mit der Ubiquitinierungen von Histonen stehen, sondern dass dies nach 24 Stunden auch sehr spezifisch für Proteine gilt, die an der Acetylierung von Histon 4 an den Lysinen 5 und 8 beteiligt sind. Eine Sichtung der Daten zeigte, dass zwei Peptide identifiziert wurden, die Acetylierungen an diesen Lysinen trugen, sowie zwei weitere an den Lysinen 12 und 16, wobei die Acetylierungen nach einer 24 Stündigen HCoV-229E Infektion induziert waren. Dementsprechend konnte auch für dieses Beispiel nicht nur die Beeinflussung von histonmodifizierenden Proteinen, sondern auch die eigentliche Histonmodifikation nachgewiesen werden (Abbildung 37). Für die Acetylierung des Histon 4 an Lysin 5 wurden zur weiteren Nachweis der Relevanz der Daten Chromatin-Immunpräzipitations-Sequenzierungen (ChIP-seq) durchgeführt, die die Induktion der Histonacetylierung durch eine HCoV-229E Infektion bestätigten (Dissertation Sascha Wittig, AG Kracht)(Poppe, Wittig et al. 2017).

Außerdem konnte festgestellt werden, dass es nach einer 24 stündigen Infektion zu einer Anreicherung von größtenteils reprimierten posttranslationalen Modifikationen an Proteinen kommt, die in direktem Zusammenhang mit dem Aufbau von *P-bodies* stehen (Abbildung 37). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob auch die Kategorie *P-body* selbst als Teil der GO Klasse *cellular component* eine signifikante Anreicherung für deregulierte posttranslationale Modifikationen an Proteinen aufwies, was für beide Infektionszeitpunkte der Fall war. Dabei wurde deutlich, dass es zum 24 Stunden Zeitpunkt vor allem an den Proteinen des *decapping*-Komplexes zu einer Akkumulation von reprimierten Phosphorylierungen kommt, wovon nur DCP2 ausgeschlossen ist, bei welchem es zu einer Induktion von Phosphorylierungen kommt (Abbildung 38).

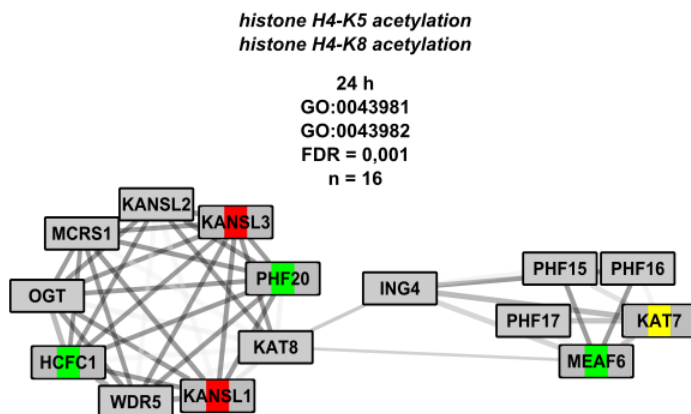
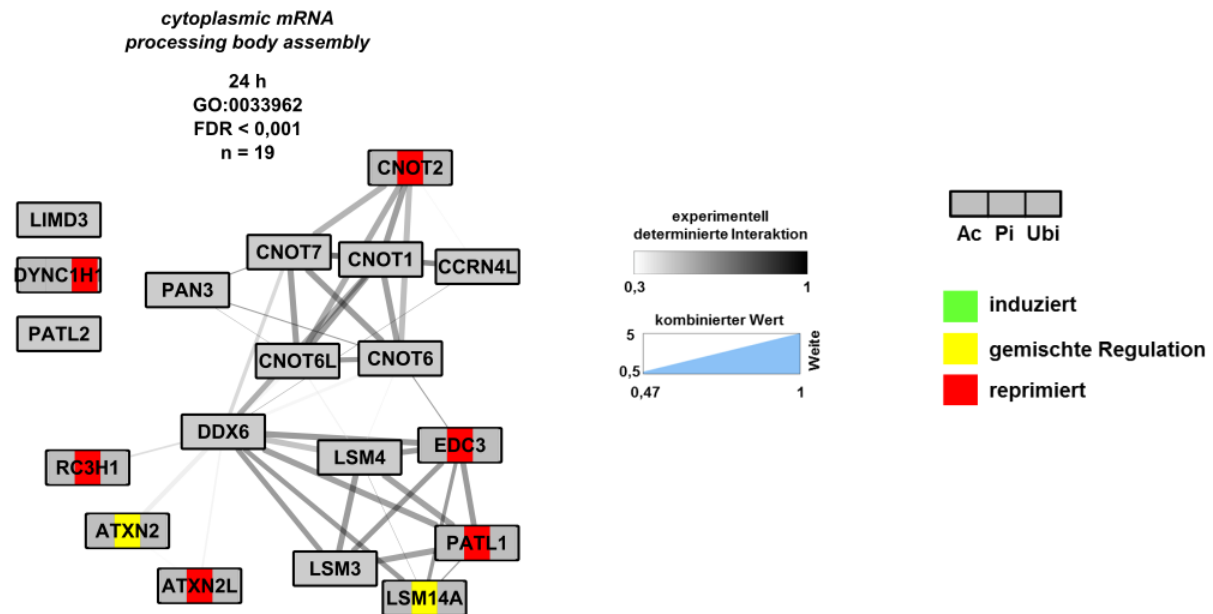
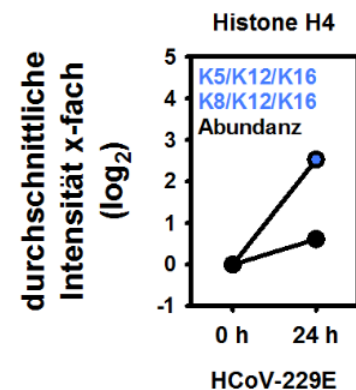
A**B**

Abbildung 37: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorien *cytoplasmic mRNA processing body assembly*, sowie *histone H4-K5 acetylation* und *histone H4-K8 acetylation*. **(A)** Für die Erstellung der Netzwerke, wurden die zu den jeweiligen GO Kategorien gehörenden Proteine aus der „AmiGO 2“ Datenbank extrahiert und anschließend in das *string onlinetool* geladen, um die zugehörigen Interaktionsdaten zu isolieren. Das dadurch entstandene Netzwerk wurde mit „Cytoscape“ visualisiert, wobei der Schwärzungsgrad der Interaktion angibt, wie stark sie experimentell belegt ist und die Dicke die Höhe des kombinierten Interaktionswertes repräsentiert (berechnet aus den Werten für Homologie, Co-Expression, *texmining*, Datenbank Informationen, Gennachbarschaft und Genfusion). Jeder Knoten repräsentiert ein Protein, wobei die Art der posttranslationalen Modifikation und die zugehörige Regulationsrichtung dem angegebenen Farbschema folgen. **(B)** Für Histon 4 wurde der gemessene Gesamtintensitätswert der Proteinabundanz über den Zeitverlauf geplottet. Außerdem wurden die gemessenen Intensitäten von zwei Peptiden geplottet, bei welchen die in blau angegebenen Aminosäuren acetyliert waren.

5 Ergebnisse

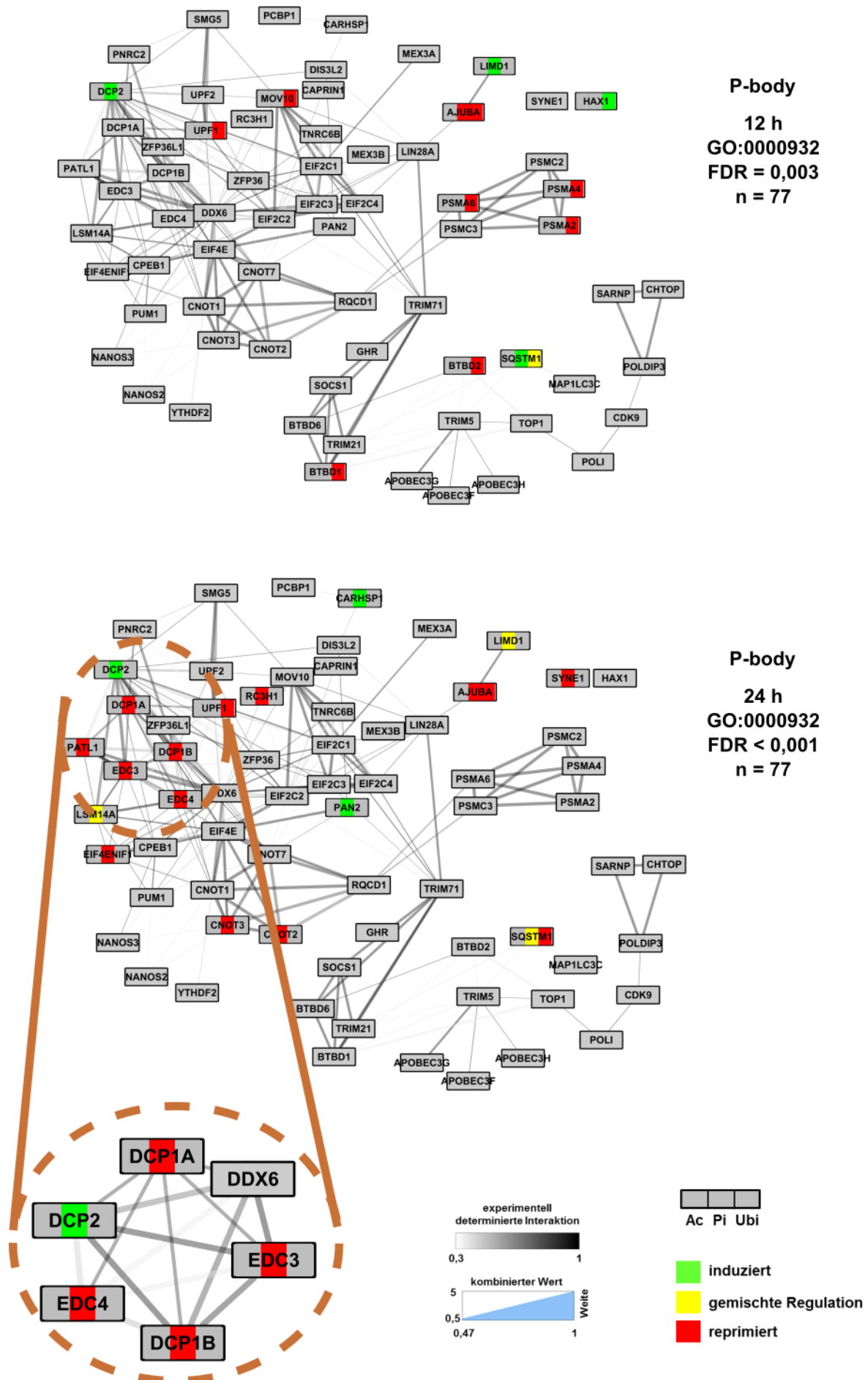


Abbildung 38: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorie *P-body*. Für die Erstellung der Netzwerke wurden die zu den jeweiligen GO Kategorien gehörenden Proteine aus der „AmiGO 2“ Datenbank extrahiert und anschließend in das *string onlinetool* geladen, um die zugehörigen Interaktionsdaten zu isolieren. Das dadurch entstandene Netzwerk wurde mit „Cytoscape“ visualisiert, wobei der Schwärzungsgrad der Interaktion angibt, wie stark sie experimentell belegt ist und die Dicke die Höhe des kombinierten Interaktionswertes repräsentiert (berechnet aus den Werten für Homologie, Co-Expression, *texmining*, Datenbank Informationen, Gennachbarschaft und Genfusion). Jeder Knoten repräsentiert ein Protein, wobei die Art der posttranslationalen Modifikation und die zugehörige Regulationsrichtung dem angegebenen Farbschema folgen. Außerdem wurden zum 24 h Zeitpunkt die Proteine des *decapping*-Komplexes vergrößert dargestellt.

Zusammenfassend offenbarte die bioinformatische Analyse der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung, dass es in Folge einer HCoV-229E Infektion in HuH7 Zellen vor allem auf der Ebene der posttranslationalen Modifikationen zu einer dramatischen Deregulierung von Prozessen kommt. Insgesamt konnten für die GO Klassen *biological process*, *cellular component* und *molecular function* je 946, 334 und 201 Kategorien identifiziert werden, bei denen es im Verlauf der HCoV-229E Infektion zu einer Anreicherung von deregulierten posttranslationalen Modifikationen kommt. Diese Kategorien umfassen Veränderungen unter anderen am Chromatin, an der Kernpore und an *P-bodies*.

5.2.3 Charakterisierung der Relevanz von *P-body* Proteinen für die virale Replikation.

Aufgrund der hohen Anzahl an deregulierten posttranslationalen Modifikationen an Proteinen die funktionell an *P-bodies* und den *decapping*-Komplex gekoppelt sind, wurde via indirekter Immunfluoreszenzfärbung untersucht, welchen Einfluss die HCoV-229E Infektion auf *P-bodies* hat. Es konnte festgestellt werden, dass sich *P-bodies* unabhängig von der untersuchten Zelllinie innerhalb von 24 Stunden auflösen (Abbildung 39). Um auszuschließen, dass der Verlust der *P-bodies* in Zusammenhang mit dem Abbau von einzelnen *P-body* Proteinen steht, wurde die Abundanz der Faktoren XRN1, EDC4, EDC3, DCP1a und DCP2 per *westernblot* bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es nicht zum Abbau der untersuchten Komponenten kommt (Abbildung 40).

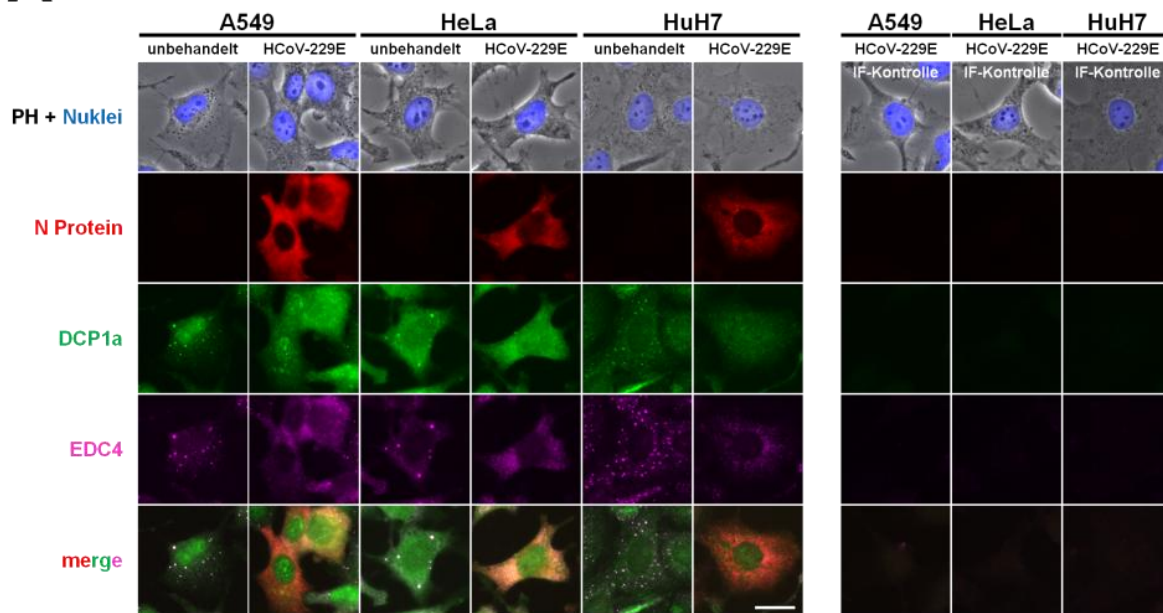
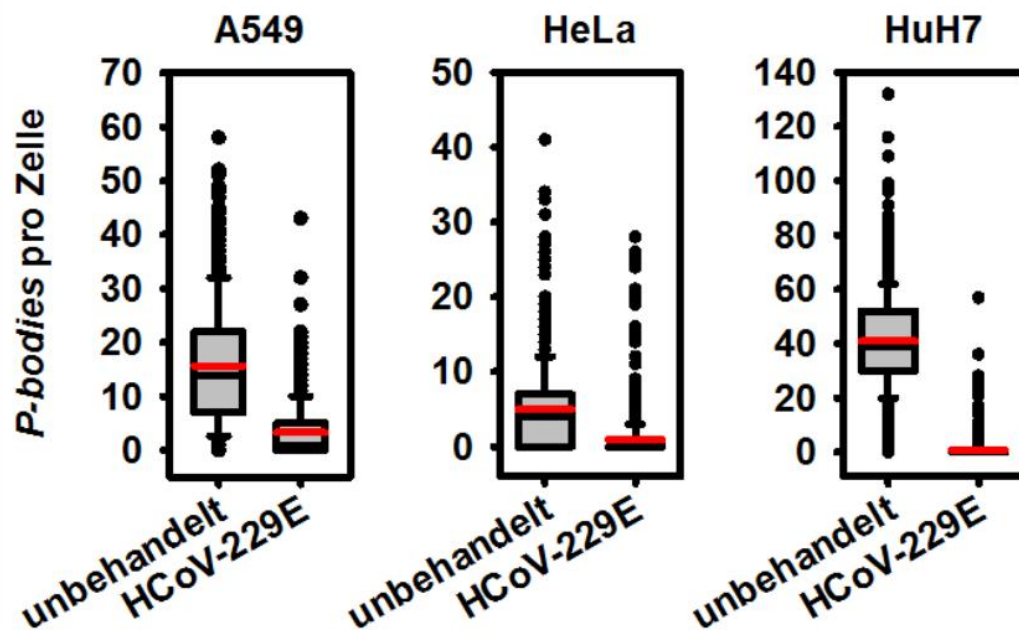
A**B**

Abbildung 39: Die Infektion mit HCoV-229E führt zum Verlust von *P-bodies* in A549, HeLa und HuH7 Zellen. Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 24 h in Kultur gehalten oder für die gleiche Zeitspanne nicht behandelt. (A) Die Infektion und die subzelluläre Verteilung von EDC4 und DCP1a wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Antikörpern gegen das virale N Protein, EDC4 und DCP1a dokumentiert. Als IF-Kontrolle (ohne Primärantikörper) dienten Zellen, die für 24 Stunden infiziert wurden. Die Kernfärbung wurde mit Höchst durchgeführt. Maßstabsbalken = 25 µm. PH = Phasenkontrast (B) Für die Quantifizierung wurden die Daten aus den drei Experimenten vereinigt, wobei die Auszählung auf Basis der EDC4 Färbung durchgeführt wurde (A549 unbehandelt n = 768; A549 HCoV-229E n = 700; HeLa unbehandelt n = 887; HeLa HCoV-229E n = 907; HuH7 unbehandelt n = 911; HuH7 HCoV-229E n = 928).

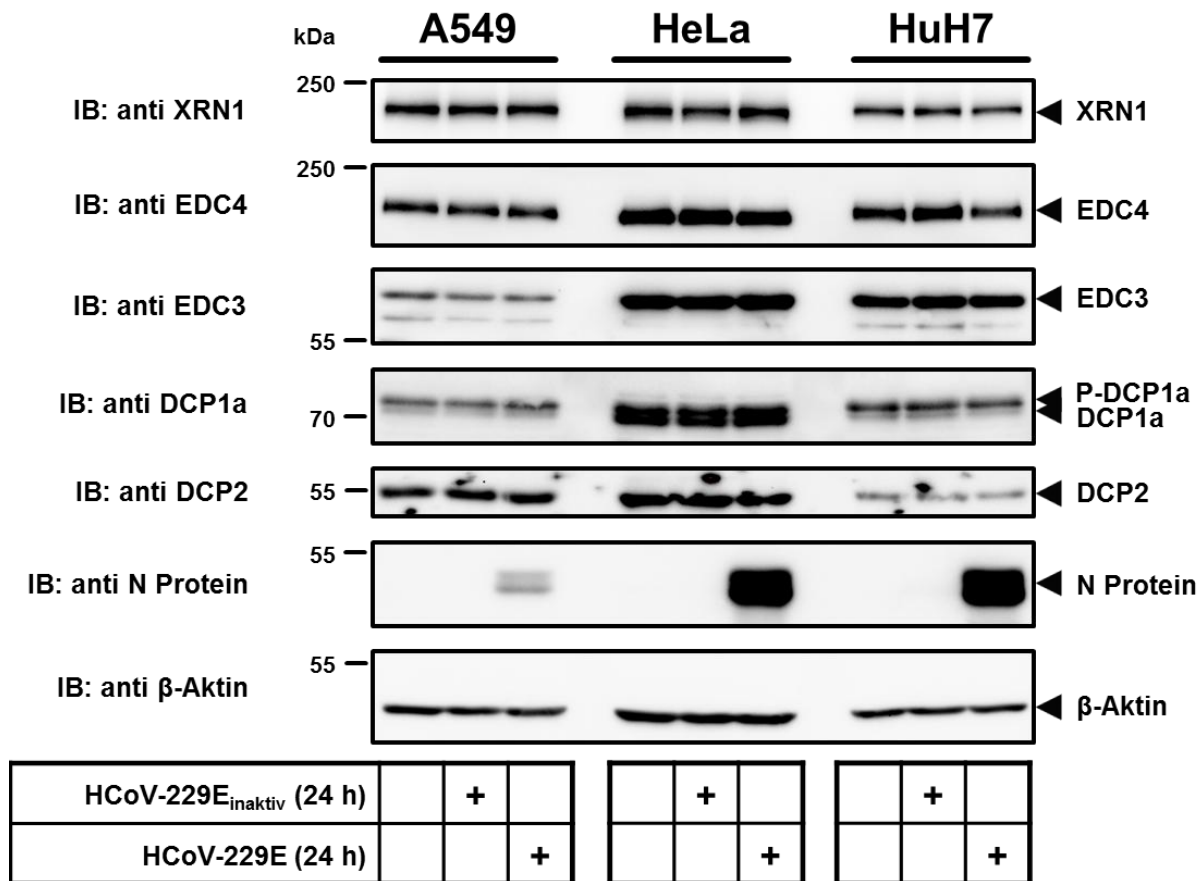


Abbildung 40: Die Infektion mit HCoV-229E führt in A549, HeLa und HuH7 Zellen nicht zur Degradierung oder Induktion essentieller *P-body* Komponenten. Die Zellen wurden in drei (A549 und HuH7), oder zwei (HeLa) unabhängigen Experimenten nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für 24 h in Kultur gehalten, beziehungsweise für die gleiche Zeitspanne mit einem hitzeinaktiviertem Virusüberstand inkubiert, oder nicht behandelt. Die Expression der angegebenen Proteine wurde aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot

Dies führte zu der Frage, ob eine der determinierten regulierten Phosphorylierungen an den Proteinen des *decapping*-Komplexes in Zusammenhang mit dem Verlust der *P-bodies* steht. Die initiale Untersuchung wurde dabei auf EDC4 fokussiert, da unveröffentlichte Daten aus unserem Labor zeigen, dass ein CRISPR-Cas9 vermittelter knockdown von EDC4 ebenfalls *P-body* Strukturen zerstört (Dissertation Ulas Tenekeci, AG Kracht). Dies konnte außerdem für einen siRNA basierten *knockdown* in HEp-2 und THP-1 Zellen gezeigt werden (Yu, Yang et al. 2005; Seto, Yoshida-Sugitani et al. 2015). Eine detaillierte Analyse der Phosphorylierungen an EDC4 auf Basis des massenspektrometrischen Datensatzes offenbarte, dass insgesamt sechs reprimierten Peptide gemessen wurden, wobei jedes zwei Phosphatgruppen trägt. Fünf dieser Peptide waren an Serin 741 phosphoryliert und die übrigen Phosphatgruppen verteilten sich auf Threonin 727, Serin 729 Serin 735, Serin 737 und Threonin 738 (Abbildung 41A). Aufgrund der Dominanz der Phosphorylierung an Serin 741 wurde ein spezifischer Antikörper für diese Aminosäure hergestellt. Die Sensitivität des

Antikörpers war nicht ausreichend, um die endogene phosphorylierte Form von EDC4 nachzuweisen, weswegen HA-markiertes EDC4 überexprimiert wurde. Die gleichzeitige Infektion mit HCoV-229E zeigte, dass auf diese Weise die infektionsbedingte Dephosphorylierung an Serin 741 nachgewiesen werden konnte. Die Überexpression hatte dabei keinen Einfluss auf die Translation des viralen N Proteins (Abbildung 41B). Darüber hinaus konnte die Spezifität des Antikörpers für das phosphorylierte EDC4 anhand der Überexpression einer nicht phosphorylierbaren Alanin, sowie einer phosphomimetischen Asparaginsäure Mutante gezeigt werden (Abbildung 41C).

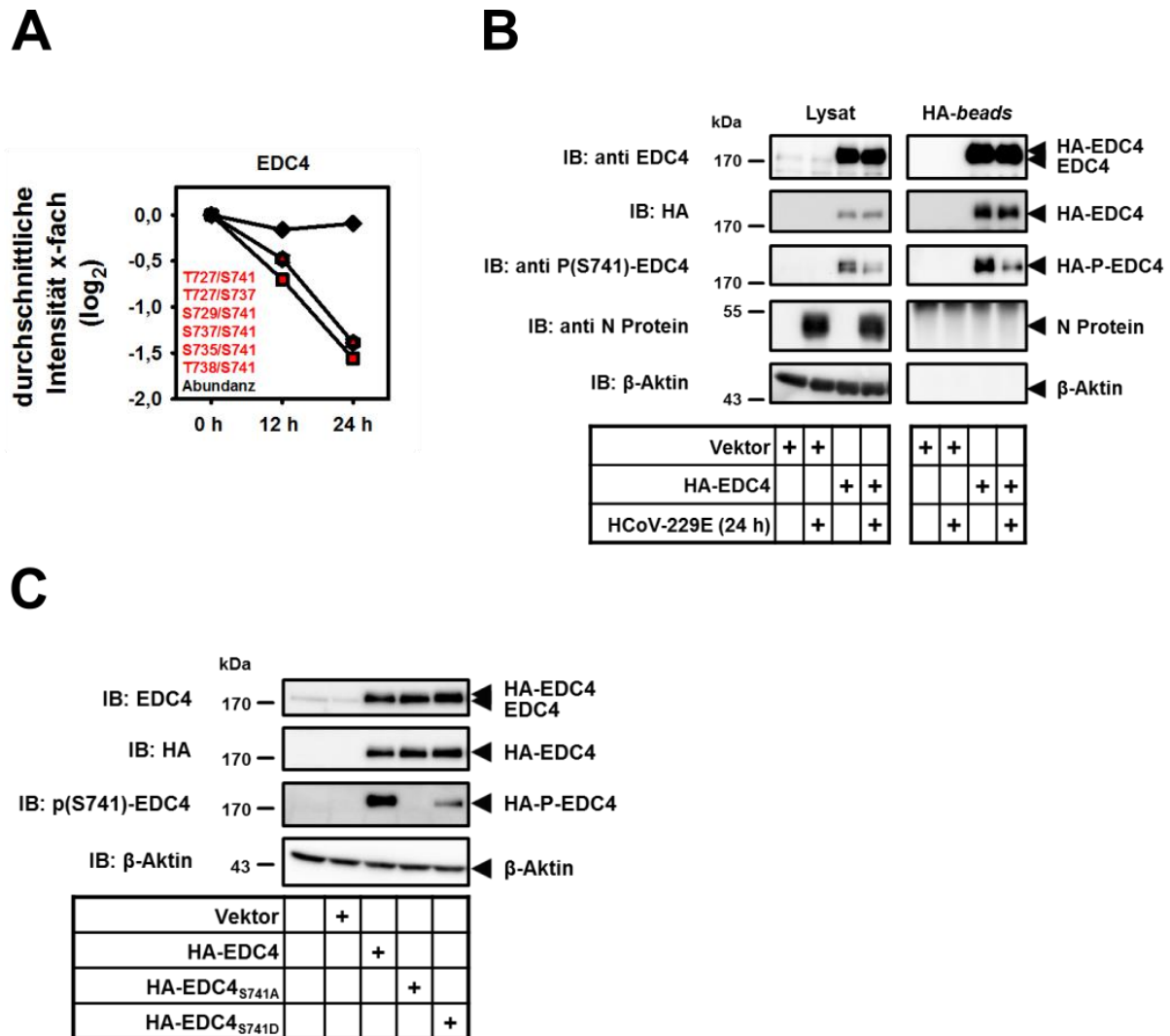


Abbildung 41: Die Infektion mit HCoV-229E führt zu einer Dephosphorylierung von EDC4 an Serin 741. (A) Für EDC4 wurden die gemessenen Gesamtintensitätswerte der Proteinabundanz aus dem HuH7 Datensatz der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung über den Zeitverlauf geplottet. Außerdem wurden die gemessenen Intensitäten von sechs reprimierten Peptiden geplottet, bei welchem die in rot angegebenen Aminosäuren Phosphorylierungen trugen. (B) HeLa Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit dem pCINeo-λN-HA-Leervektor oder dem pCINeo-λN-HA-EDC4 Vektor transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) inkubierten die Zellen für 24 h in Kultur, oder wurden für die gleiche Zeitspanne nicht behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert (Bohmann-Weiß-Lyse) und für eine Immunpräzipitation (IP) des überexprimierten HA-EDC4 verwendet. Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde danach sowohl für die Ganzzellysate als auch für die

5 Ergebnisse

Präzipitationsproben per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin diene als Ladungskontrolle. (C) HeLa Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit den Vektoren pCINeo- λ N-HA-Leervektor, pCINeo- λ N-HA-EDC4, pCINeo- λ N-HA-EDC4_{S741A} oder pCINeo- λ N-HA-EDC4_{S741D} transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (Speziallyse). Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde danach per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin diene als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot

Um zu testen, ob die EDC4 Phosphorylierung an Serin 741 relevant für die HCoV-229E Replikation ist, wurden im nächsten Schritt EDC4 Mutanten überexprimiert, um die Zellen anschließend zu infizieren. Weder die Expression der phosphorylierungsinkompetenten Alanin Mutante, noch der phosphomimetischen Asparaginsäure Mutante hatten einen Einfluss auf die Translation des viralen N Proteins oder dessen Phosphorylierung an den Serinen 364 und 367. Gleiches gilt für die Expression einer Deletionsmutante, bei der alle Aminosäuren entfernt wurden, die während der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung phosphoryliert nachgewiesen werden konnten. Obwohl die phosphorylierungsinkompetente Alanin Mutante und die Deletionsmutante nach der HCoV-229E Infektion eine schwache Abnahme der ektopischen EDC4 Expression zeigten, konnte diese nur in einem von zwei Experimenten beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass diese Expressionsabnahmen technischer Natur sind (Abbildung 43).

5 Ergebnisse

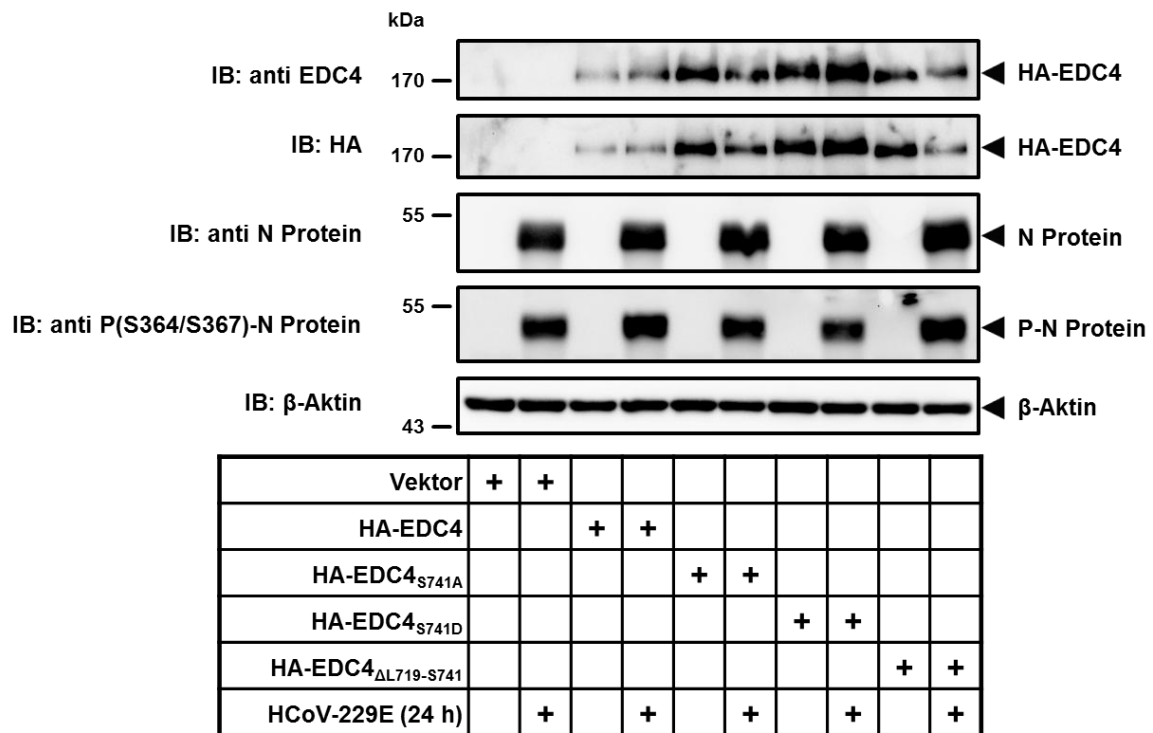


Abbildung 42: Die EDC4 Phosphorylierung an Serin 741 hat im Zellkultursystem keine Relevanz für die Translation des viralen N Protein oder dessen Phosphorylierung an den Serinen 364/367. HeLa Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit den Vektoren pCINeo-λN-HA-Leervektor, pCINeo-λN-HA-EDC4, pCINeo-λN-HA-EDC4_{S741A}, pCINeo-λN-HA-EDC4_{S741D} oder pCINeo-λN-HA-EDC4_{ΔL719-S741} transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) inkubierten die Zellen für 24 h in Kultur, oder wurden für die gleiche Zeitspanne nicht behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert (Guanidiniumhydrochloridlyse). Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde danach per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die EDC4 Phosphorylierung an Serin 741 die Lokalisierung in *P-bodies* beeinflusst. Dafür wurden alle in Abbildung 42 verwendeten EDC4 Varianten erneut exprimiert und über indirekte Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Es stellte sich heraus, dass alle Mutanten in der Lage waren in *P-bodies* zu lokalisieren, sodass die EDC4 Phosphorylierung an Serin 741 keinen nennenswerten Einfluss auf die *P-body* Bildung zu haben scheint (Abbildung 43).

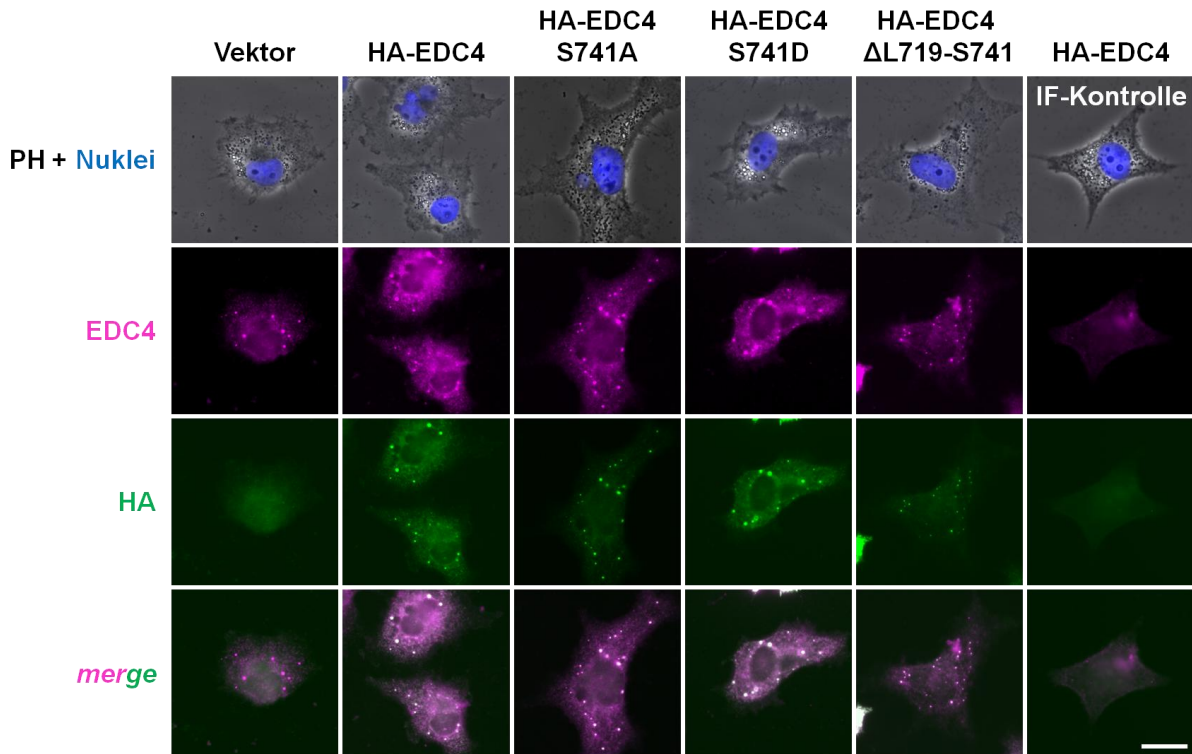
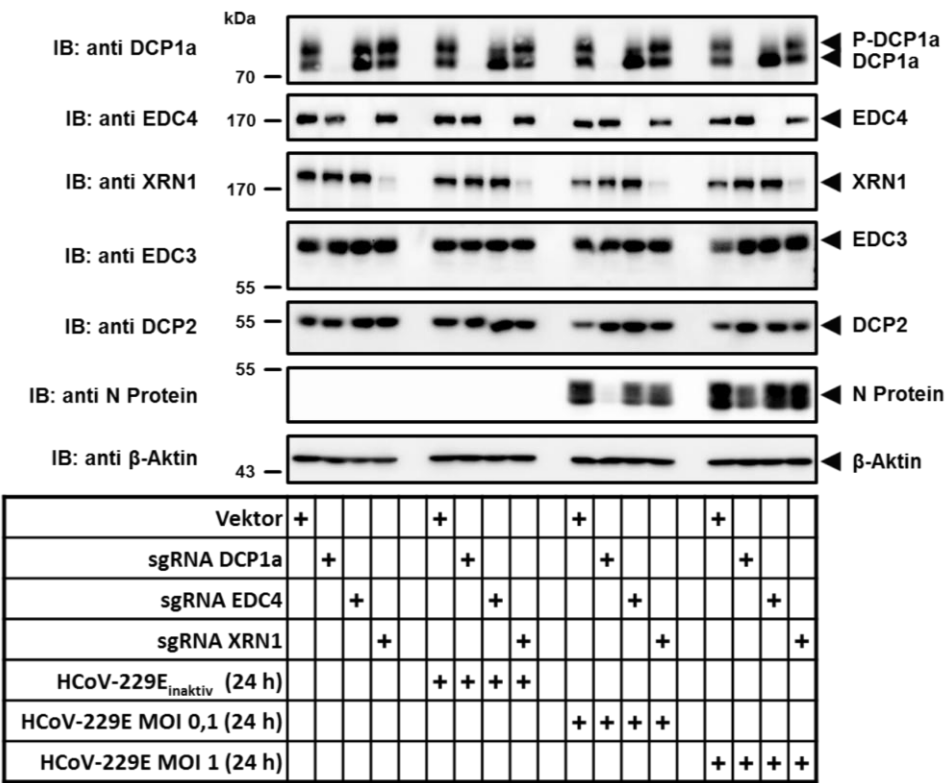


Abbildung 43: Die EDC4 Phosphorylierung an Serin 741 hat keinen Einfluss auf die HA-EDC4 Lokalisierung in *P-bodies*. HeLa Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit den Vektoren pCINeo-λN-HA-Leervektor, pCINeo-λN-HA-EDC4, pCINeo-λN-HA-EDC4_{S741A}, pCINeo-λN-HA-EDC4_{S741D} oder pCINeo-λN-HA-EDC4_{ΔL719-S741D} transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Die subzelluläre Verteilung der EDC4 Mutanten wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Antikörpern gegen den HA-tag und EDC4 dokumentiert. Als IF-Kontrolle (ohne Primärantikörper) dienten pCINeo-λN-HA-EDC4 transfizierte Zellen. Die Kernfärbung wurde mit Höchst durchgeführt. Maßstabsbalken = 25 µm. PH = Phasenkontrast

Um zu testen, ob die Expression von EDC4 für eine erfolgreiche HCoV-299E Replikation relevant ist, wurden im nächsten Schritt Zellen infiziert, in denen über die CRISPR-Cas9 Methode ein konstitutiver EDC4 *knockdown* induziert wurde. Ergänzend wurden außerdem Zellen infiziert, in denen ein CRISPR-Cas9 vermittelter DCP1a oder XRN1 *knockdown* induziert wurde. Die virale Replikation, gemessen an der Translation des N Proteins, war durch den Verlust von EDC4 und XRN1 um ca. 30% reduziert bei einer Infektion mit einer niedrigen MOI von 0,1. Dieser Effekt war bei einer MOI von 1 nicht messbar. Die CRISPR-Cas9 vermittelte Depletierung der DCP1a Abundanz führte darüber hinaus zu einer deutlich verringerten Menge an viralem N Protein von über 80% bei einer MOI von 0,1. Bei einer MOI von 1 sank der Effekt auf 30% (Abbildung 44).

A



B

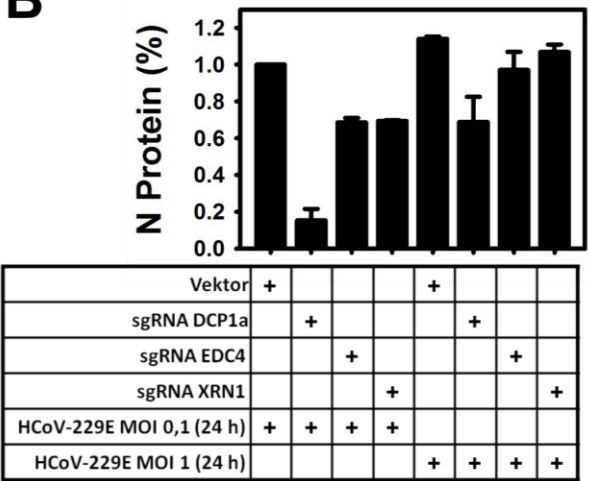


Abbildung 44: Die sgRNA vermittelte stabile Suppression von DCP1a, EDC4 und XRN1 beeinflusst die virale Translation vor allem bei einer niedrigen MOI. HeLa Zellen wurden stabil mit einem pX459 Leervektor, einem pX459 sgRNA DCP1a Vektor, einem *pool* aus drei pX459 sgRNA EDC4 Vektoren oder einem pX459 sgRNA XRN1 Vektor transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in zwei unabhängigen Experimenten nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1 oder MOI = 0,1) für 24 h in Kultur gehalten, beziehungsweise für die gleiche Zeitspanne mit einem hitzeinaktiviertem Virusüberstand inkubiert, oder nicht behandelt. **(A)** Aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) wurde anschließend die Expression der angegebenen Proteine per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot **(B)** Die Quantifizierung der N Protein Menge erfolgte mit Hilfe der „ImageJ“ und der „ImageLab“ Software. Gezeigt ist das prozentuale Verhältnis der N Protein Menge \pm s.e.m. relativ zur infizierten Vektorkontrolle (MOI 0,1).

Da der DCP1a abhängige Effekt deutlich dominanter war, als der EDC4 und der XRN1 abhängige, wurde im Folgenden die Relevanz von DCP1a für die HCoV-229E Replikation genauer untersucht. Um auszuschließen, dass es sich bei dem DCP1a abhängigen Effekt auf die virale Proteinsynthese um ein Artefakt der CRISPR-Cas9 vermittelten Langzeitselektion handelt, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem die DCP1a Menge in HeLa Zellen transient über RNAi depletiert wurde, wobei die Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert wurden. Auch in diesem Experiment hatte der DCP1a *knockdown* einen negativen Effekt auf die virale Replikation, sowohl auf Ebene der N Protein Synthese, als auch Basis der Synthese viraler gRNA. Die Effekte waren allerdings verglichen mit dem CRISPR-Cas9 Ansatz deutlich geringer (80% zu 30%). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die RNAi vermittelte Depletion von DCP1a zu einer Erhöhung der basalen *IL8* Expression führt, was zeigt, dass DCP1a den konstitutiven mRNA Abbau vermittelt (Abbildung 45).

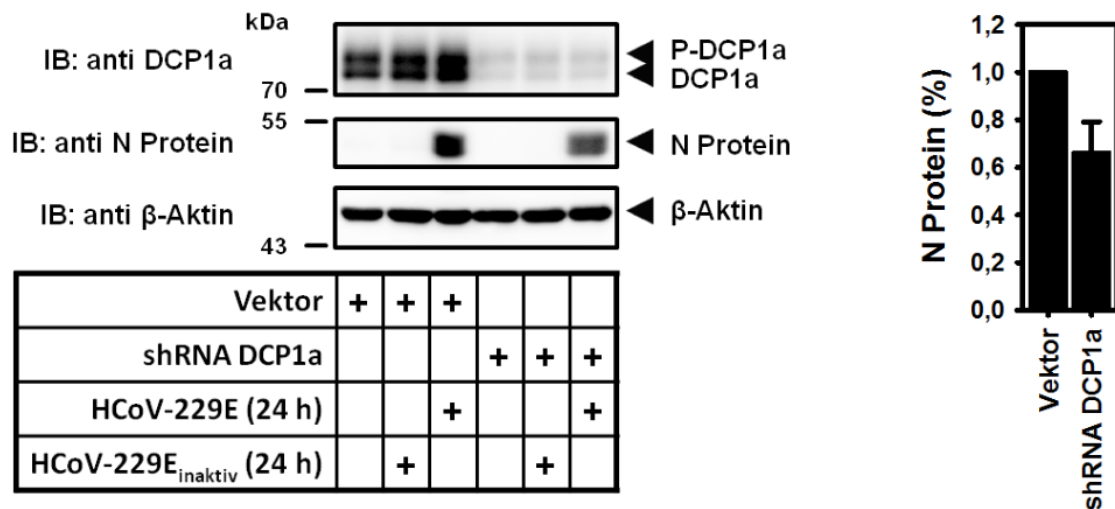
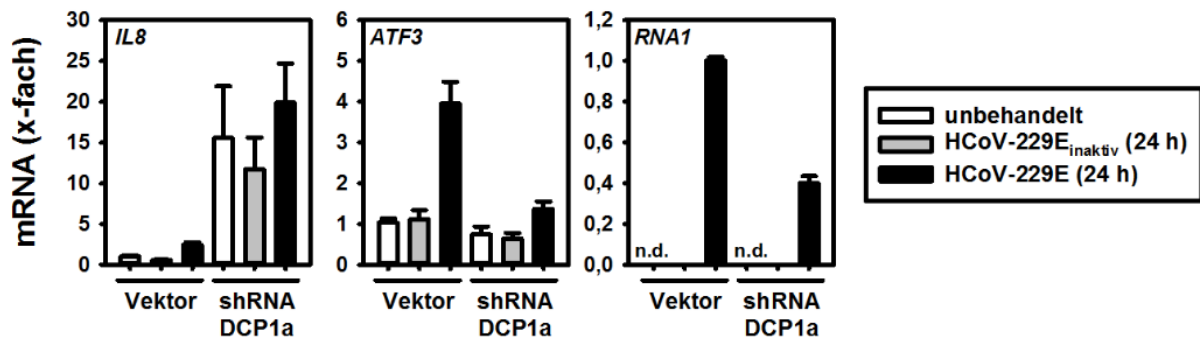
A**B**

Abbildung 45: Die shRNA vermittelte Suppression von DCP1a verringert die virale Transkription und Translation in HeLa Zellen und beeinflusst die basale Expression von *IL8*. HeLa Zellen wurden in vier unabhängigen Experimenten transient mit dem pSuper.puro Leervektor, oder dem pGeneClip shRNA DCP1a Vektor transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Am Folgetag wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, bis sie sich vom Zellkulturgefäß ablösen und anschließend 1:15 (pGeneClip shRNA DCP1a) oder 1:20 (pSuper.puro Leervektor) in neue Zellkulturschalen geteilt und für weitere drei Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektiert. Anschließend wurden die Zellen nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 0,1) für 24 h in Kultur gehalten, beziehungsweise für die gleiche Zeitspanne mit einem hitzeinaktiviertem Virusüberstand inkubiert, oder nicht behandelt (**A**) Aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) wurde die Expression von DCP1a und des viralen N Proteins per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot Die Quantifizierung der N Protein Menge erfolgte mit Hilfe der Software „Image Lab“. Gezeigt ist das prozentuale Verhältnis der N Protein Menge +/- s.e.m. relativ zur infizierten Vektorkontrolle. (**B**) Die mRNA-Expressionen von *IL8* und *ATF3*, sowie des viralen RNA Abschnittes, der für das *NSP8*-Protein kodiert (*RNA1*) wurden mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. relativ zur unbehandelten Vektorkontrolle (*IL8*, *ATF3*), oder zur infizierten Vektorkontrolle (*RNA1*). Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Nina Hofmann durchgeführt.

Um die Relevanz von DCP1a für die Replikation des HCoV-229E weiter zu validieren, wurde der RNAi vermittelte Ansatz zur Depletion der DCP1a Menge in A549 Zellen wiederholt, da diese Zelllinie von epithelialen Lungenzellen abstammt und daher die physiologische Situation besser rekapituliert. Überraschenderweise kehrte sich der DCP1a *knockdown* Effekt auf die virale Replikation um, da es zu einer verstärkten N Protein Synthese, einer verstärkten viralen RNA Synthese und zu einer Erhöhung des messbaren Virustiters kommt. Darüber hinaus, kam es durch den DCP1a *knockdown* erneut zu einer Erhöhung der basalen *IL8* Expression, wobei der Effekt, verglichen mit HeLa Zellen, deutlich geringer ausfiel (Abbildung 46).

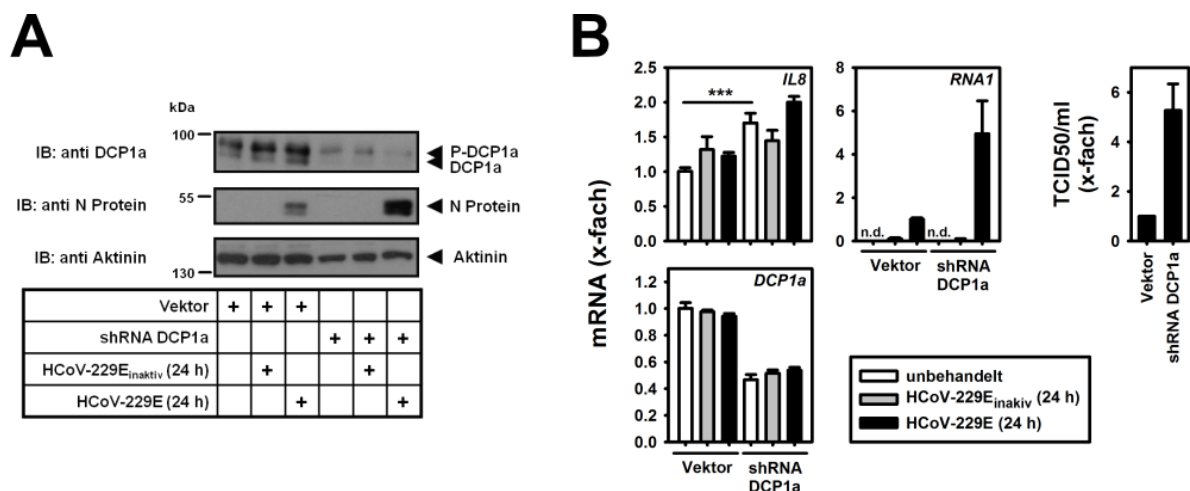


Abbildung 46: Die shRNA vermittelte Suppression von DCP1a verstärkt die virale Replikation in A549 Zellen und beeinflusst die Basale Expression von *IL8*. A549 Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten transient mit dem pSuper.puro Leervektor, oder dem pGeneClip shRNA DCP1a Vektor transfiziert (*Lipofectamin LTX Plus*). Am Folgetag wurden die Zellen für drei Tage mit 1 µg/ml Puromycin selektiert. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, bis sie sich vom Zellkulturgefäß ablösen und anschließend auf drei kleinere Zellkulturschalen verteilt und für weitere 24 h in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen nach der Infektion mit intaktem Virusüberstand (MOI = 1) für weitere 24 h in Kultur gehalten, beziehungsweise für die gleiche Zeitspanne mit einem hitzeinaktiviertem Virusüberstand inkubiert, oder nicht behandelt. **(A)** Aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) wurde die Expression von DCP1a und des viralen N Proteins per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes Aktinin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot **(B)** Die mRNA-Expressionen von *DCP1a* und *IL8*, sowie des viralen RNA Abschnittes, der für das *NSP8*-Protein kodiert (*RNA1*) wurden mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. relativ zur unbehandelten Vektorkontrolle (*DCP1a*, *IL8*), oder zur infizierten Vektorkontrolle (*RNA1*). Die statistische Signifikanz der Expressionsabweichungen wurde mittels t-Test ermittelt (*** = p < 0,001). Die Titerbestimmung erfolgte mittels TCID₅₀ assay.

Zusammenfassend konnte in Kapitel 5.2 gezeigt werden, dass virale Proteine aktiv posttranslational modifiziert werden. Für die C-terminalen Phosphorylierungen am N Protein konnte nachgewiesen werden, dass diese PERK abhängig reguliert werden und relevant für die generelle Virusreplikation sind, was nahelegt, dass der HCoV-229E induzierte ER Stress Signalweg essentiell für eine erfolgreiche HCoV-229E Replikation ist.

Außerdem zeigte die Analyse der markierungsfreien massenspektrometrische Quantifizierung, dass es in HuH7 Zellen im Verlauf der HCoV-229E Infektion zu einer Vielzahl an deregulierten posttranslationalen Modifikationen an zellulären Proteinen kommt. Eine bioinformatische Anreicherungsanalyse offenbarte, dass diese Proteine mit deregulierten posttranslationalen Modifikationen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine Rolle spielen, was beispielhaft für Chromatinprozesse, die Kernpore und *P-bodies* hervorgehoben wurde.

Da in dieser Analyse auch festgestellt werden konnte, dass sich im Verlauf der HCoV-229E Infektion zelluläre *P-bodies* auflösen, ohne dass dies durch einen Abbau der *P-body* Komponenten DCP1a, DCP2, EDC3, EDC4 und XRN1 erklärt werden konnte, wurde die Relevanz des essentiellen P-body Proteins EDC4 genauer untersucht. Dessen HCoV-229E abhängige Dephosphorylierung an Serin 741 konnte experimentell validiert werden, jedoch führte die Überexpression einer phosphorylierungsinkompetenten – und einer phosphomimetischen Mutante nicht zu einer Veränderung der HCoV-229E Replikation, oder der Lokalisierung dieser Mutanten in *P-bodies*. Auch die CRISPR-Cas9 vermittelte Depletion von EDC4 und XRN1 führte in HeLa Zellen zu keiner Veränderung der HCoV-229E Replikation auf Basis der N Protein Synthese, wohingegen die Depletion von DCP1a zu einer verminderte Replikation führt, was in unabhängigen Experimenten über einen RNAi vermittelten DCP1a *knockdown* bestätigt wurde. In A549 Zellen hingegen kommt es durch einen RNAi vermittelten DCP1a *knockdown* zu einer verstärkten HCoV-229E Replikation.

5.3 Charakterisierung von TRAF6 abhängigen posttranslationalen Modifikationen am decapping-Regulator DCP1a im Rahmen des IL-1a abhängigen proinflammatorischen Signalweges

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass der *decapping*-Komplex eine essentielle Struktur für die Replikation des HCoV-229E darstellt. Darüber hinaus offenbarte vor allem der *knockdown* von DCP1a, dass der *decapping*-Komplex am Beispiel von *IL8* an der Expressionsregulation von Genen beteiligt ist, die in Zusammenhang mit dem proinflammatorischen Signalweg stehen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Rolle von DCP1a und dessen posttranslationalen Modifikationen genauer analysiert.

5.3.1 DCP1a spielt eine essentielle Rolle für die Expression IL-1a abhängiger Gene und wird TRAF6 abhängig posttranslational modifiziert

Um DCP1a abhängige Effekte auf den proinflammatorischen Signalweg zu charakterisieren, wurde zunächst in HEK293 IL-1R Zellen über RNAi eine DCP1a Depletion induziert, um anschließend den Effekt auf die Expression von *IL8* zu analysieren. Dies wurde im Rahmen einer Kinetik erfasst. Es zeigte sich, dass der DCP1a *knockdown* den basalen Expressionslevel von *IL8* erhöht, wie es bereits in A549 und HeLa Zellen beobachtet wurde. Darüber hinaus offenbarte das Experiment, dass es nicht wie in den Kontrollzellen zu einem Abfall der *IL8* Expression nach acht Stunden kommt. Stattdessen verbleibt der Expressionslevel von *IL8* auf dem erhöhten Niveau, wie er bereits nach drei Stunden zu beobachten ist (Abbildung 47).

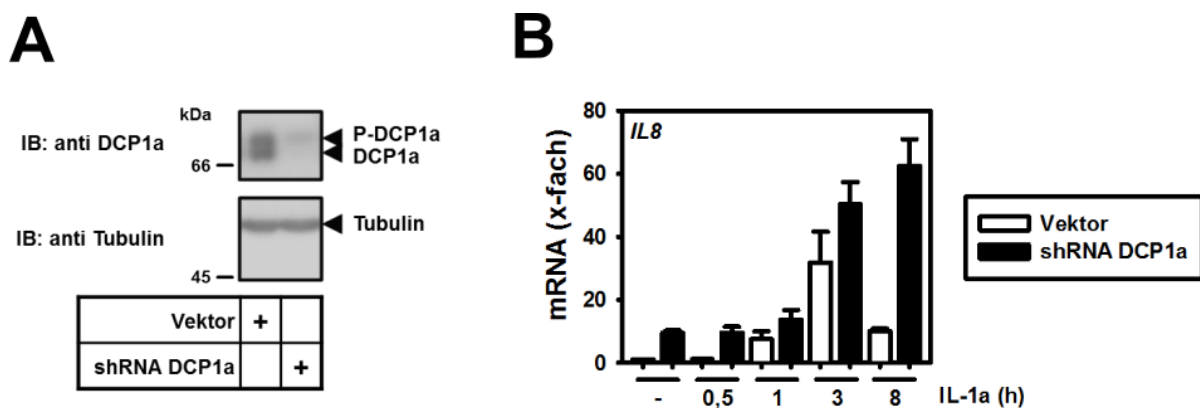


Abbildung 47: Die shRNA vermittelte Suppression von DCP1a beeinflusst die basalen und die IL-1a stimulierten Expressionslevel von *IL8*. HEK293 IL-1R Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten transient mit dem pGeneClip shRNA *noncoding* Vektor, oder dem pGeneClip shRNA DCP1a Vektor transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen für weitere drei Tage mit 2 µg/ml Puromycin selektiert. (A) Aus Ganzzelllysaten (Speziallyse) wurde die Expression von DCP1a per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes Tubulin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (B) Die Zellen wurden zusätzlich für die angegebenen Zeitintervalle mit 10 ng/ml IL-1a stimuliert. Die mRNA-Expression von *IL8* wurde mittels RT-qPCR gemessen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der Genexpression +/- s.e.m. relativ zur unbehandelten Vektorkontrolle.

Bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass DCP1a direkt durch JNK phosphoryliert wird. Hierbei kann JNK durch Zytokine (IL-1), Translationsinhibitoren (Anisomycin) oder auch direkt durch die Expression eines TAK1-TAB1 Fusionsproteins aktiviert werden (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Um festzustellen, ob dieser Effekt auch durch die Überexpression weiterer Komponenten des IL-1 Signalweges induziert wird, wurden HEK293 IL-1R Zellen mit MYC-DCP1a, FLAG-TRAF6 und HA-JNK beziehungsweise der inaktiven Mutante HA-JNK K55R transfiziert. Es zeigte sich, dass die Überexpression von TRAF6 und DCP1a bereits zu

einer verstärkten DCP1a Expression führt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die TRAF6 Expression den CMV Promotor des MYC-DCP1a Vektors stimuliert. Durch die gleichzeitige Expression von JNK kommt es zusätzlich zu einer Verschiebung der DCP1a Bande zu einer höheren molekularen Masse, was ein starkes Indiz für eine Hyperphosphorylierung ist. Dieser Effekt kann nicht mit der inaktiven Mutante von JNK beobachtet werden.

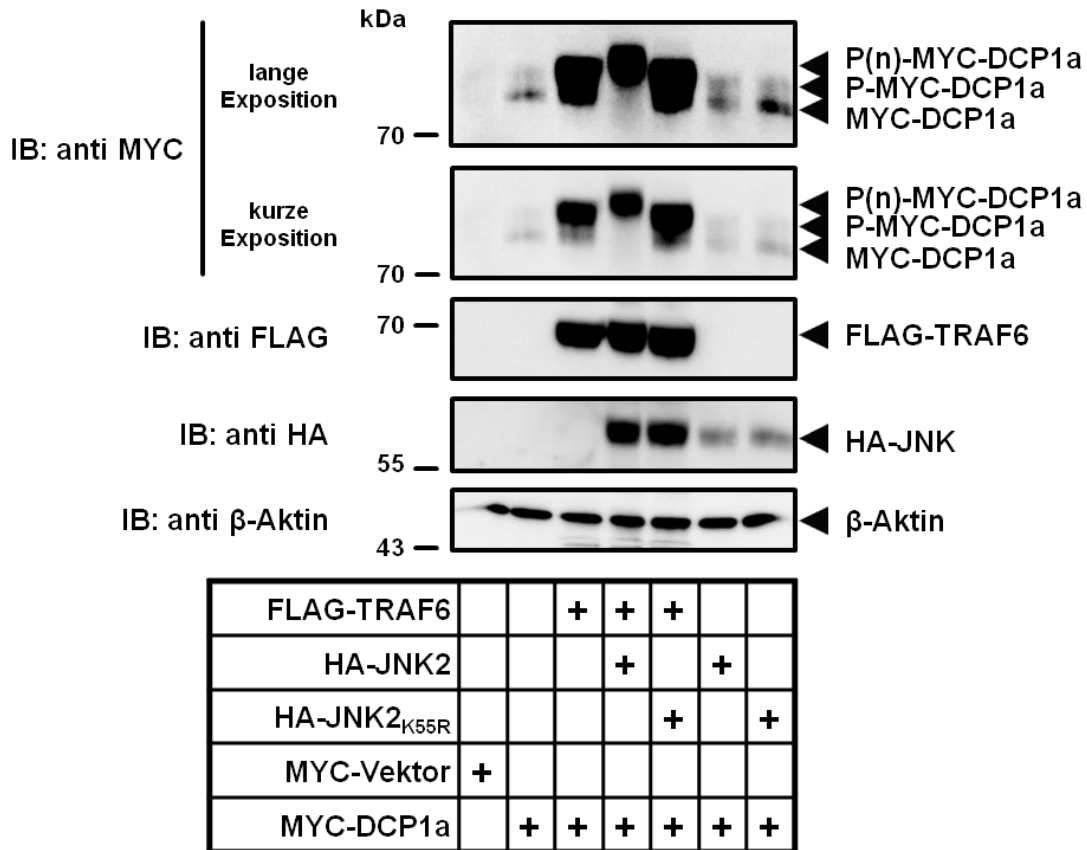


Abbildung 48: Die gleichzeitige Überexpression von TRAF6 und JNK2 führt zu einer Hyperphosphorylierung von DCP1a. HEK293 IL-1R Zellen wurden mit den Vektoren pcDNA3-MYC Leervektor, pcDNA3-MYC-DCP1a, peVHA-JNK2, peVHA-JNK2_{K55R} und pCR3.1-FLAG-TRAF6 wie angegeben transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (Speziallyse). Die Expression der angegebenen Proteine wurde danach per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot

Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob das Verhältnis von TRAF6 zu DCP1a relevant für die Induzierung der Phosphorylierung an DCP1a ist. Dafür wurden HEK293 IL-1R Zellen mit ansteigenden Mengen von FLAG-TRAF6 bei konstanten MYC-DCP1a Menge transfiziert. Obwohl es bei hohen TRAF6 Konzentrationen auch zur stärksten JUN Aktivierung kam, was eine erfolgreiche JNK Aktivierung impliziert, kehrte sich der Effekt auf die DCP1a Phosphorylierung an Serin 315 um, sodass bei der geringsten TRAF6 Konzentration die stärkste DCP1a Phosphorylierung zu beobachten war. Nichtsdestotrotz konnten sowohl die JUN als auch die DCP1a Phosphorylierung mit dem JNK

Inhibitor SP600125 gehemmt werden, was zeigt, dass beide Prozesse von JNK vermittelt werden (Abbildung 49).

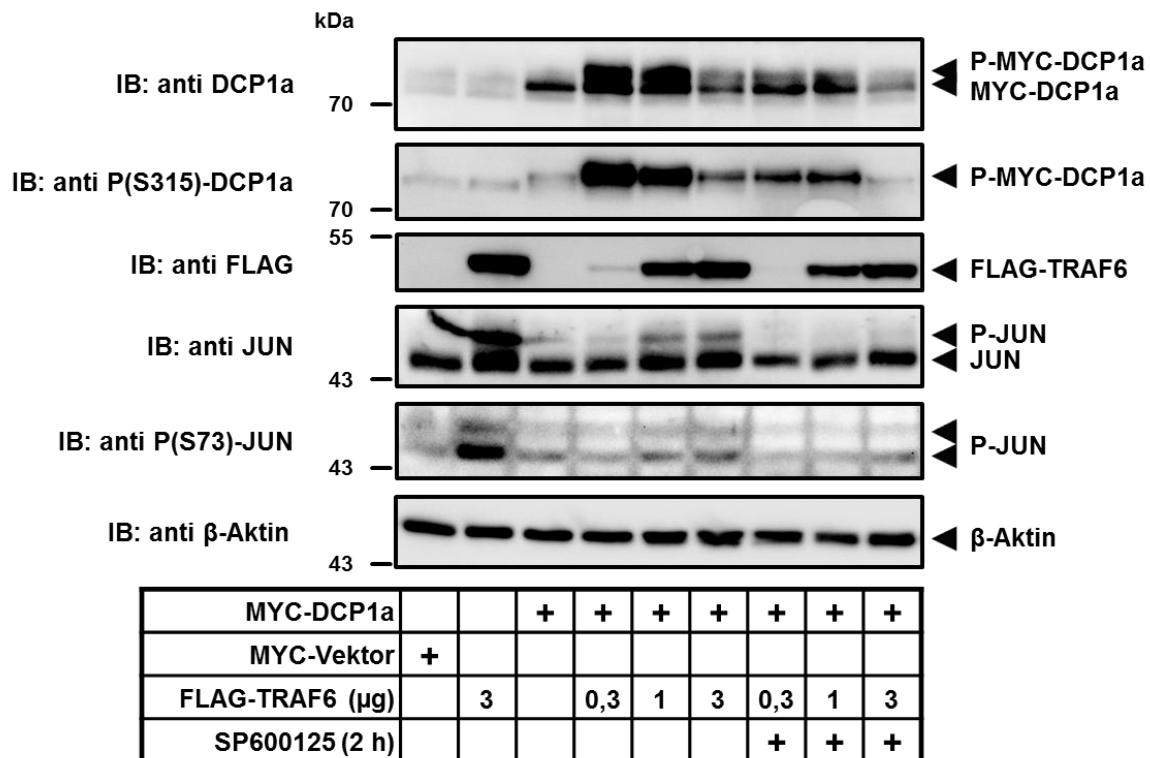


Abbildung 49: Die TRAF6 induzierte Phosphorylierung von DCP1a ist abhängig vom Verhältnis der beiden Proteine zueinander. HEK293 IL-1R Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit den Vektoren pcDNA3-MYC Leervektor, pcDNA3-MYC-DCP1a und pCR3.1-FLAG-TRAF6 in den angegebenen Konzentrationen transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (Speziallyse), wobei in einem Ansatz die Proben zuvor für zwei Stunden mit dem JNK Inhibitor SP600125 (20 µM) behandelt wurden. Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde danach per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (Tenekeci, Poppe et al. 2016)

Da TRAF6 primär als Ubiquitin E3 Ligase beschrieben ist, die K63 verknüpfte Ubiquitinketten auf sich selbst und auf Zielproteine überträgt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob DCP1a neben der Phosphorylierung auch TRAF6 abhängig ubiquitiniert wird. Dafür wurden HEK293 IL-1R Zellen mit HIS-Ubiquitin und FLAG-TRAF6 transfiziert, um ubiquitiniertes DCP1a über einen Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure (NTA) *pulldown* anzureichern. Auf diese Weise konnte mit zwei DCP1a Antikörpern eine distinkte Bande, sowie ein Schmier identifiziert werden, was ein Nachweis für ubiquitiniertes DCP1a darstellt. Sowohl der Schmier, als auch die einzelne Bande wurden bei gleichzeitiger Expression von FLAG-TRAF6 verstärkt, was belegt, dass TRAF6 die Ubiquitinierung von DCP1a induziert (Abbildung 50A). Darüber hinaus wurde Ubiquitin in einem weiteren Versuch per Immunpräzipitation angereichert, um über einen *westernblot* ubiquitiniertes DCP1a nachzuweisen.

Mit dem DCP1a Antikörper konnten, unabhängig vom IL-1a Stimulus, vier distinkte Banden nachgewiesen werden, die wahrscheinlich konstitutiv ubiquitiniertes DCP1a darstellen, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass DCP1a Ubiquitinketten tragen kann (Abbildung 50).

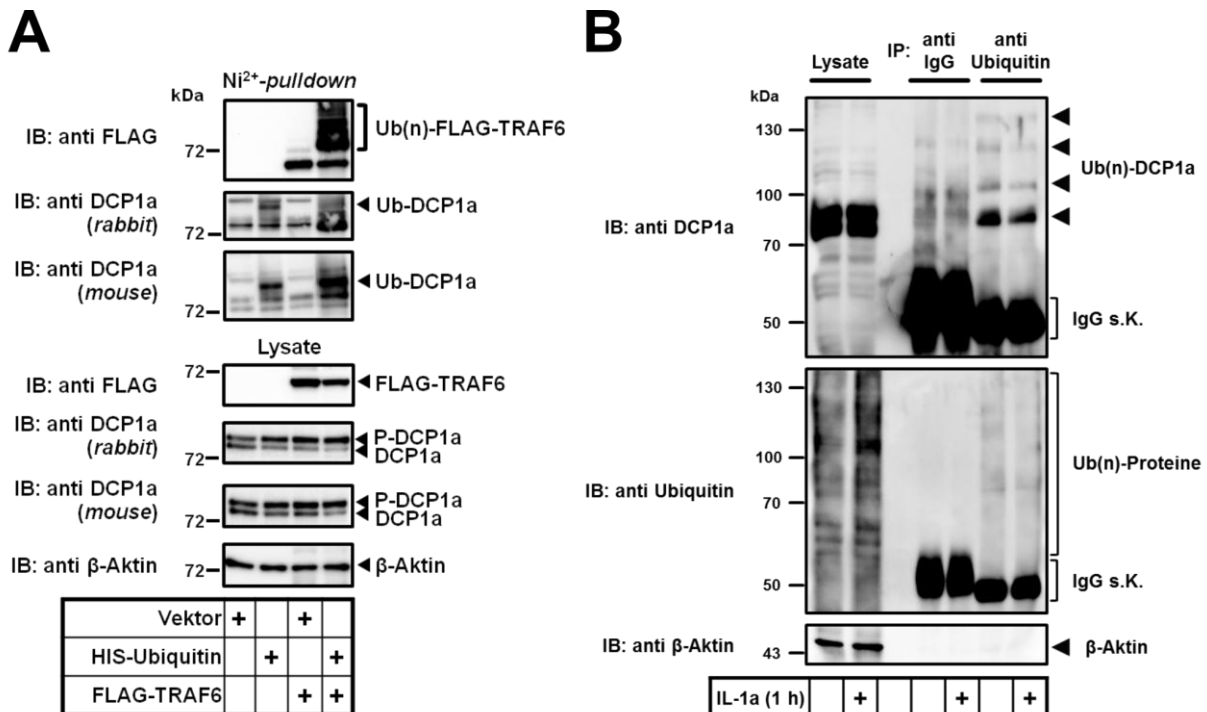


Abbildung 50: Endogenes DCP1a wird TRAF6 abhängig ubiquitiniert. (A) HEK293 IL-1R Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit den Vektoren pDEST26-HIS-Leervektor oder pDEST26-HIS-Ubiquitin und pCR3.1-FLAG-TRAF6 wie angegeben transient transfiziert (Ca_2PO_4 -Methode). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (Guanidiniumhydrochloridlyse), um anschließend einen *pulldown* von HIS-tag ubiquitinierten Proteinen durchzuführen. Die Expression und Ubiquitinierung der angegebenen Proteine wurde danach sowohl für Ganzzelllysaten als auch die *pulldown* Proben per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Die Experimente wurden in Kooperation mit Helmut Müller durchgeführt. (B) HEK293 IL-1R Zellen wurden für eine Stunde mit IL-1a (10 ng/ml) behandelt, oder nicht behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und lysiert (ChIP Lyse), um anschließend eine Immunpräzipitation mit einem ubiquitinspezifischen Antikörper durchzuführen. Als Kontrollantikörper wurden ImmunglobulinG (IgG) Antikörper verwendet. Die Expression und Ubiquitinierung der angegebenen Proteine wurde danach per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; s.K. = schwere Kette; IB = Immunoblot (Tenekeci, Poppe et al. 2016)

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass DCP1a relevant für die Expression IL-1a abhängiger Gene ist, da der *knockdown* bereits basal die *IL8* Expression erhöht und darüber hinaus es nach acht Stunden Stimulation nicht zu einer Abnahme der *IL8* mRNA Menge kommt. Außerdem induziert TRAF6 die JNK abhängige Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315. Neben der Phosphorylierung an Serin 315 induziert eine TRAF6 Aktivierung auch eine konstitutive Ubiquitinierung von DCP1a.

5.3.2 Die C-Terminale Trimerisierung von DCP1a ist essentiell für die Phosphorylierung und die Ubiquitinierung von DCP1a

Da die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass DCP1a TRAF6 abhängig phosphoryliert und ubiquitiniert wird, wurden im nächsten Schritt DCP1a Mutanten untersucht, um mit deren Hilfe weitere Details dieser Prozesse aufzuklären. DCP1a zeichnet sich neben den JNK regulierten Phosphorylierungsstellen an Serin 315 und 319 und der Ubiquitinierbarkeit an verschiedenen Lysinen dadurch aus, dass es im C-Terminus eine bereits charakterisierte Trimerisierungsdomäne besitzt. Trimerisierungsinkompetente Mutanten von DCP1a sind nicht mehr in der Lage in *P-bodies* zu lokalisieren und zeigen keine *decapping* Aktivität (Tritschler, Braun et al. 2009). Daher wurde eine MYC-DCP1a Mutante untersucht, in welcher der C-Terminus deletiert wurde (Δ 515-582), sowie eine Mutante in der vier für die Trimerisierung relevante Aminosäuren mutiert waren (L551R/ I555S/ F561R/ L565S im weiteren als Mutante 3 (MT3) bezeichnet). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation der sechs C-Terminalen Lysine in DCP1a (K520-577R) zu einer verminderten Interaktionsfähigkeit mit anderen *decapping*-Faktoren führt und die *decapping* Aktivität vermindert (Tenekeci, Poppe et al. 2016). Aus diesem Grund wurde auch diese Mutante untersucht, in der die sechs C-Terminalen Lysine, die potentiell als Ubiquitinakzeptoren dienen könnten zu Arginin mutiert waren, sowie eine Mutante, die sowohl die MT3 als auch die K520-577R Mutation trägt. Um zu validieren, dass die eingefügten für eine Trimerisierung relevanten Mutationen (MT3 und Δ 515-582), verhindern, dass die einzelnen DCP1a Proteine miteinander interagieren, wurden HEK293 IL-1R Zellen mit GFP-DCP1a und den MYC-DCP1a Mutanten transfiziert. Anschließend wurde GFP-DCP1a über GFP-*beads* aus Ganzzelllysaten präzipitiert, um die Interaktion mit den MYC-DCP1a Mutanten zu analysieren. Sowohl für MYC-DCP1a als auch für MYC-DCP1a K520-577R konnten Interaktionen mit GFP-DCP1a nachgewiesen werden, während dies für die übrigen Mutanten nicht der Fall war, was validiert, dass diese Mutanten tatsächlich nicht mehr mit weiteren DCP1a Proteinen interagieren können. Die Lysine K520-577 sind dagegen für eine Trimerbildung nicht essentiell (Abbildung 51).

5 Ergebnisse

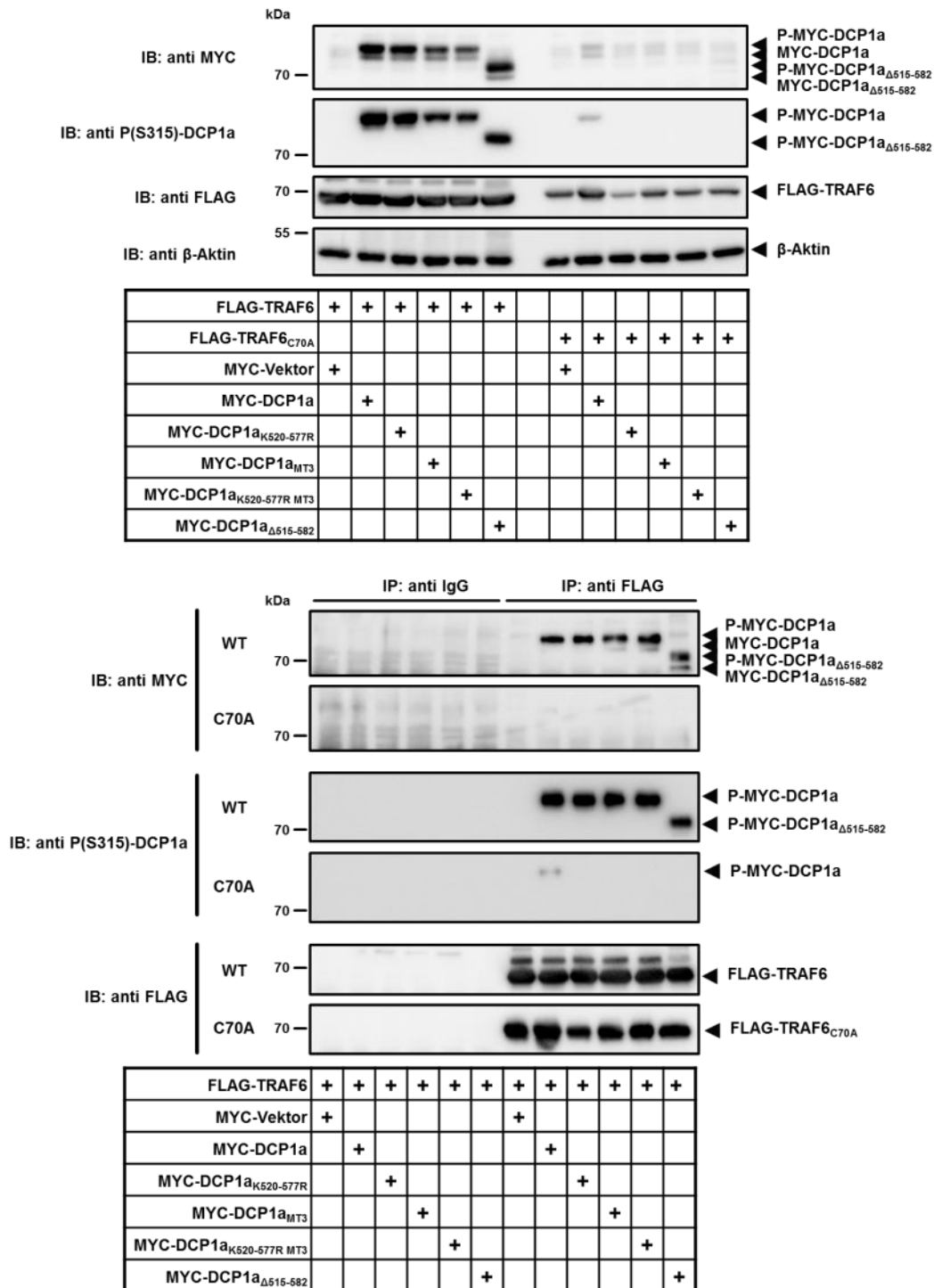


Abbildung 52: Abhängigkeit der TRAF6:DCP1a Interaktion von der TRAF6 Aktivität. HEK293 IL-1R Zellen wurden mit pCR3.1-FLAG-TRAF6 oder pCR3.1-FLAG-TRAF6_{C70A} zusammen mit den Vektoren pcDNA3-MYC Leervektor, pcDNA3-MYC-DCP1a, pcDNA3-MYC-DCP1a_{K520-577R}, pcDNA3-MYC-DCP1a_{MT3}, pcDNA3-MYC-DCP1a_{K520-577R MT3} und pcDNA3-MYC-DCP1a_{Δ515-582} transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (Bohmann-Weiss-Lyse), um anschließend eine Immunpräzipitation mit einem FLAG-tag spezifischen Antikörper durchzuführen. Als Kontrollantikörper wurden ImmunglobulinG (IgG) Antikörper verwendet. Die Expression und Phosphorylierung der angegebenen Proteine wurde aus Ganzzelllysaten und den Immunpräzipitationsproben anschließend per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (Tenekeci, Poppe et al. 2016)

Darüber hinaus wurde der Versuch mit GAL4-DCP1a und einer GAL4-DCP1a Mutante ($\Delta 124-390$), der die Transaktivierungsdomäne fehlt, durchgeführt (Bai, Koester et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass TRAF6 auch mit dieser Mutante interagiert, was die Interaktionsdomänen auf die DCP1a Aminosäuren 1-123 und 391-514 eingegrenzt (Abbildung 53).

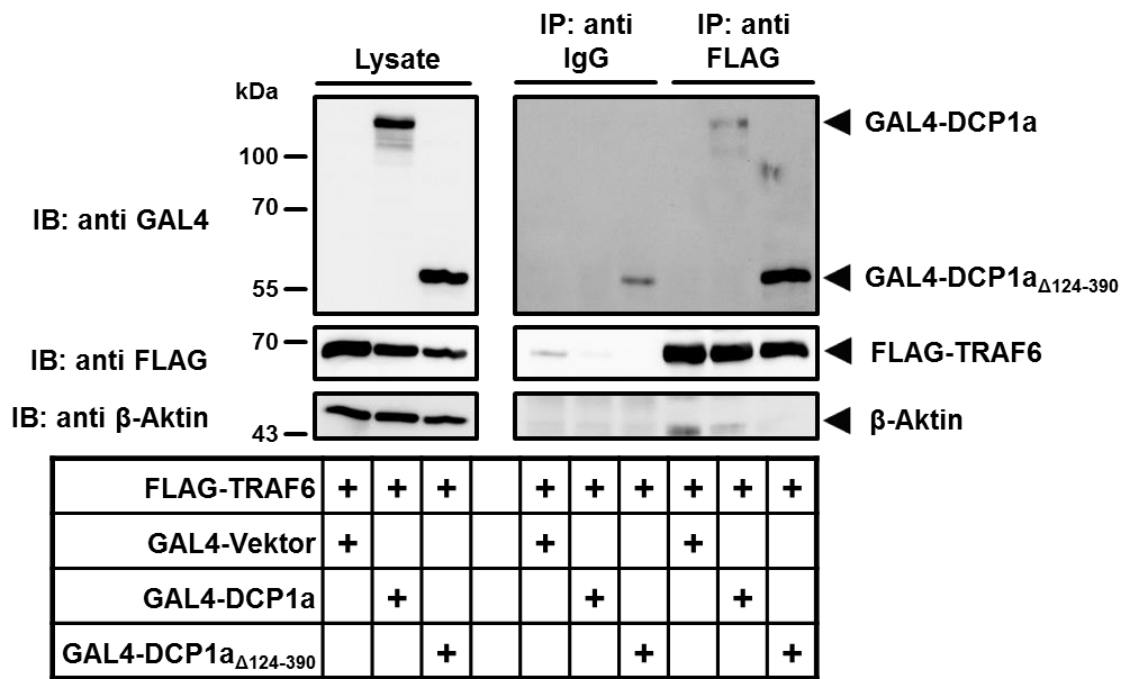


Abbildung 53: Eingrenzung der DCP1a Domäne für die TRAF6 Interaktion. HEK293 IL-1R Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit pCR3.1-FLAG-TRAF6 und den Vektoren pFA-GAL4 Leervektor, pFA-GAL4-DCP1a oder pFA-GAL4-DCP1a $\Delta 124-390$ transient transfiziert (Ca_2PO_4 -Methode). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (Bohmann-Weiss-Lyse), um anschließend eine Immunpräzipitation mit einem FLAG-tag spezifischen Antikörper durchzuführen. Als Kontrollantikörper wurden ImmunglobulinG (IgG) Antikörper verwendet. Die Expression der angegebenen Proteine wurde aus Ganzzelllysaten und den Immunpräzipitationsproben anschließend per *western blot* analysiert. Antikörpermarkiertes β -Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (Tenekeci, Poppe et al. 2016)

Um die Relevanz des C-Terminus von DCP1a und dessen Trimerisierungskompetenz auf die Phosphorylierbarkeit und die Ubiquitinierbarkeit zu testen, wurden HEK293 IL-1R Zellen mit HIS-Ubiquitin und den DCP1a Varianten K520-577R, MT3, K520-577R/MT3 und $\Delta 515-582$ transfiziert. Die Ganzzelllysate wurden anschließend für Ni^{2+} -NTA *pulldowns* verwendet. Die Analyse ergab, dass die HIS-Ubiquitin Überexpression die Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 induziert, vorausgesetzt, die verwendete DCP1a Variante war trimerisierungskompetent, was darauf hinweist, dass die DCP1a Trimerisierung eine Voraussetzung für die Phosphorylierung ist. Darüber hinaus konnte für alle Mutanten bis auf die $\Delta 515-582$ Mutante gezeigt werden, dass sie ubiquitiniert werden, was darauf hinweist, dass der C-Terminus zwar relevant für die Rekrutierung von E3-Ubiquitinligasen

5 Ergebnisse

wie TRAF6 ist, die eigentlichen Ubiquitinketten aber an Domänen außerhalb des C-Terminus ligiert werden (Abbildung 54).

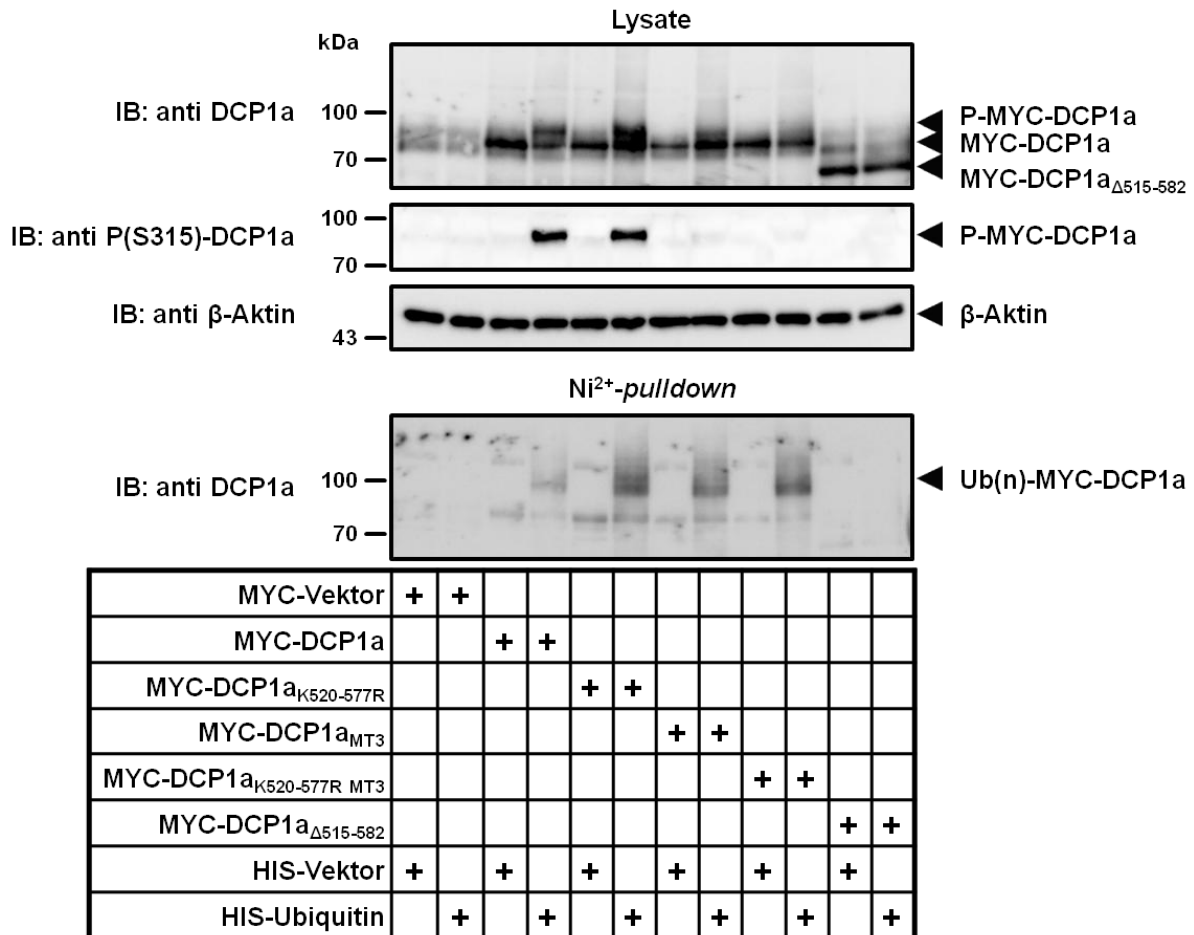


Abbildung 54: Der C-Terminus von DCP1a stellt eine essentielle Domäne für die DCP1a Ubiquitinierung dar und die Trimerisierungskompetenz ist essentiell für die Phosphorylierung an S315. HEK293 IL-1R Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit den Vektoren pDEST26-HIS-Leervektor oder pDEST26-HIS-Ubiquitin sowie den Vektoren pcDNA3-MYC-Leervektor, pcDNA3-MYC-DCP1a, pcDNA3-MYC-DCP1a_{K520-577R}, pcDNA3-MYC-DCP1a_{MT3}, pcDNA3-MYC-DCP1a_{K520-577R MT3} oder pcDNA3-MYC-DCP1a_{Δ515-582} wie angegeben transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (Guanidiniumhydrochloridlyse), um anschließend einen *pulldown* von HIS-tag ubiquitinierten Proteinen durchzuführen. Die Expression, Phosphorylierung und Ubiquitinierung der angegebenen Proteine wurde danach sowohl aus Ganzzelllysaten als auch aus den *pulldown* Proben per *westernblot* analysiert. Antikörpermarkiertes β-Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa = Kilodalton; IB = Immunoblot (Tenekeci, Poppe et al. 2016)

Um festzustellen, ob die Mutation der sechs C-terminalen Lysine zu Arginin einen Einfluss auf die *P-body* Bildung hat, wurden die Mutanten in HEK293 IL-1R Zellen exprimiert und über indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl MYC-DCP1a als auch MYC-DCP1a K520-577R in *P-bodies* lokalisieren. Die drei trimerisierungsinkompetenten Mutanten,

waren ausschließlich zytoplasmatisch verteilt. Darüber hinaus, zeigte die Analyse, dass nur in *P-bodies* lokalisiertes DCP1a mit dem phosphospezifischen Antikörper gegen Serin 315 nachgewiesen werden konnte, was den Schluss zulässt, dass DCP1a nur an oder innerhalb von *P-bodies* phosphoryliert wird (Abbildung 55A). Weiterhin zeigte eine Quantifizierung der *P-bodies*, dass die Mutation der sechs C-Terminalen Lysine zu einer Erhöhung der *P-body* Anzahl führt (Abbildung 55B). Zusätzliche Experimente der Arbeitsgruppe zeigten auch eine Veränderung der *P-body* Größe, wenn Zellen mit der DCP1a K520-577R Mutante transfiziert wurden (Tenekeci, Poppe et al. 2016).

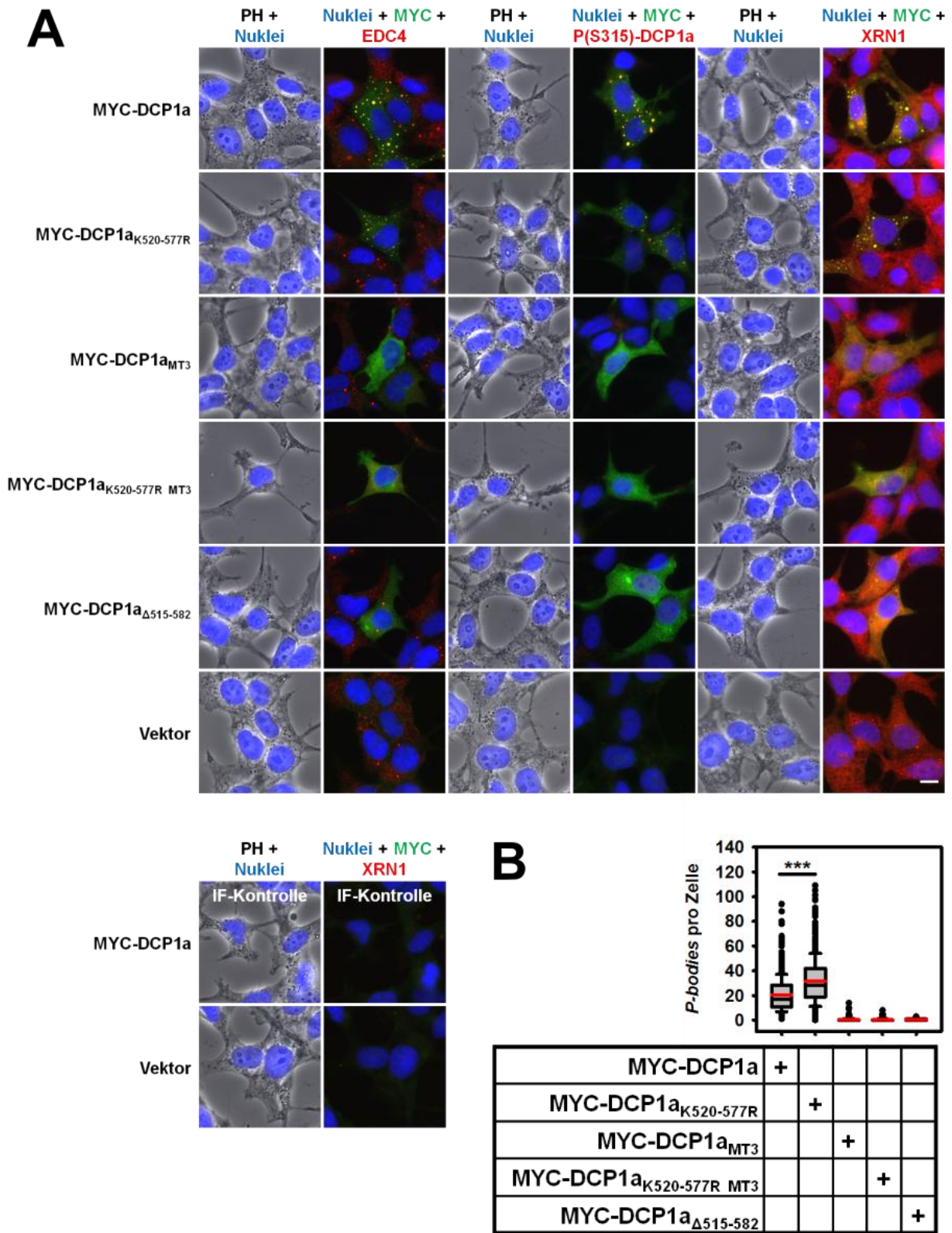


Abbildung 55: Die C-terminalen Mutationen in MYC-DCP1a beeinflussen dessen Lokalisation in *P*-bodies und dessen Phosphorylierung an Serin 315. (A) HEK293 IL-1R Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit den Vektoren pcDNA3-MYC Leervektor, pcDNA3-MYC-DCP1a, pcDNA3-MYC-DCP1a_{K520-577R}, pcDNA3-MYC-DCP1a_{MT3}, pcDNA3-MYC-DCP1a_{K520-577R MT3} und pcDNA3-MYC-DCP1a_{Δ515-582} transient transfiziert (Ca₂PO₄-Methode). Die subzelluläre Verteilung der MYC-DCP1a Mutanten, sowie deren Phosphorylierung und Ko-Lokalisation mit EDC4 und XRN1 wurde

5 Ergebnisse

mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Antikörpern gegen den MYC-tag, P(S315)-DCP1a, XRN1 und EDC4 dokumentiert. Als IF-Kontrolle (ohne Primärantikörper) dienten pcDNA3-MYC Leervektor und pcDNA3-MYC-DCP1a transfizierte Zellen. Da es sich dabei um den gleichen Ansatz für jede Bedingung handelt, wurde nur die IF-Kontrolle mit der längsten Belichtungszeit dargestellt (XRN1). Die Kernfärbung wurde mit Höchst durchgeführt. Maßstabsbalken = 25 µm. PH = Phasenkontrast (**B**) Für die Quantifizierung wurden die Daten aus den drei Experimenten vereinigt, wobei die Auszählung auf Basis der MYC Färbung durchgeführt wurde (MYC-DCP1a n = 700; MYC-DCP1a_{K520-577R} n = 718; MYC-DCP1a_{MT3} n = 657; MYC-DCP1a_{K520-577R, MT3} n = 657; MYC-DCP1a_{Δ515-582} n = 631). Die statistische Signifikanz der Änderungen der *P-Body* Anzahl wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt (*** = p < 0,001). (Tenekeci, Poppe et al. 2016)

Zusammenfassend konnte in Kapitel 5.3 gezeigt werden, dass DCP1a einen essentieller Faktor für die Genregulation in Folge eines IL-1a Stimulus darstellt. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass DCP1a JNK abhängig an Serin 315 phosphoryliert wird, wobei TRAF6 eine essentielle Rolle spielt. TRAF6 induziert außerdem eine Ubiquitinierung von DCP1a. Die DCP1a Domäne, die direkt mit aktivem TRAF6 interagiert konnte nicht determiniert werden, aber es wurde nachgewiesen, dass DCP1a unabhängig von der C-Terminalen Trimerisierungskompetenz ubiquitiniert wird. Die generelle Existenz des C-Terminus hingegen ist essentiell für die Ubiquitinierung. Die DCP1a Phosphorylierung hingegen findet nur an trimerisierungskompetentem DCP1a statt, wenn sie durch eine Ubiquitinüberexpression induziert wird. Außerdem kann phosphoryliertes DCP1a nur in *P-bodies* nachgewiesen werden. Hingegen können alle DCP1a Mutanten phosphoryliert werden, wenn gleichzeitig TRAF6 überexprimiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass die JNK abhängige Phosphorylierung von DCP1a unter anderem von TRAF6 reguliert wird, da dieses die DCP1a Lokalisierung und Ubiquitinierung beeinflusst. Das daraus resultierende Modell wird ausführlich in Kapitel 6.3 dargelegt und in Abbildung 57 zusammengefasst.

6 Diskussion

6.1 Identifizierung HCoV-229E spezifisch deregulierter Gene auf Ebene des Transkriptoms

Coronaviren stellen bis heute eine ernstzunehmende Gefahr für infizierte Individuen dar und verursachen erhebliche Kosten für Gesundheitssysteme und die Tiermast (Song and Park 2012; Koplan, Butler-Jones et al. 2013). Dies wird vor allem an den kürzlich entstandenen zoonotischen Formen SARS-CoV und MERS-CoV deutlich, bei welchen die Mortalität bis zu 50% erreichen kann (Graham, Donaldson et al. 2013). Obwohl seit der SARS Epidemie in China mit über 1000 toten 15 Jahre vergangen sind, gibt es bis heute keine spezifischen zugelassenen Medikamente gegen Coronaviren. Infizierten Individuen können ausschließlich symptomatisch behandelt werden (Zumla, Chan et al. 2016). Wie die meisten RNA Viren vollziehen Coronaviren ihren Lebenszyklus primär im Zytoplasma der Wirtszelle. Dabei kommt es im Rahmen der Infektion zur Ausbildung von *double membrane vesicles* (DMV), mit denen der virale *replicase transcription complex* (RTC) assoziiert ist (Oostra, te Lintelo et al. 2007). Da dafür Lipide aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verwendet werden, kommt es zu einer Umstrukturierung von Wirtsorganellen und es ist hochgradig unwahrscheinlich, dass die Wirtszelle dies nicht wahrnimmt (Fung and Liu 2014). Da vor allem das ER von der Infektion betroffen ist, konnte für verschiedene Coronaviren gezeigt werden, dass es im Verlauf der Infektion zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges kommt. Dennoch wurden die Coronavirus induzierten Signalwege bisher kaum im Detail untersucht (Fung and Liu 2014). Es gibt eine Reihe transkriptombasierter Studien, in denen die Wirtsantwort auf eine Coronavirus Infektion untersucht wurde, aber die Autoren fokussierten die Auswertung in den meisten Fällen auf die induzierten inflammatorischen Gene (Dar, Munir et al. 2005; Leong, Tan et al. 2005; Aich, Wilson et al. 2007; Raaben, Groot Koerkamp et al. 2007; Tang, Chan et al. 2009; Yoshikawa, Hill et al. 2010; Cong, Liu et al. 2013; Sims, Tilton et al. 2013; Chatterjee, Addya et al. 2014; Chhabra, Chantrey et al. 2015; Mehrbod, Harun et al. 2015; Shuid, Safi et al. 2015; VanLeuven, Ridenhour et al. 2017). Die meisten dieser Studien blieben außerdem sehr deskriptiv, wurden nur mit unbehandelten Kontrollen verglichen, oder umfassten sehr frühe Zeitpunkte, in denen die Aktivierung von Signalwegen nicht nachgewiesen werden konnte, beziehungsweise sehr späte Zeitpunkte, zu denen hauptsächlich apoptotische Signalwege erfasst wurden. Um die globale Wirtsantwort in Zellen zu erfassen, in denen eine aktive Coronavirus Replikation stattfindet, in denen es aber noch nicht zu einem deutlichen Zellsterben kommt, wurden daher vergleichende *microarray* Studien in zwei Zelllinien durchgeführt.

6.1.1 *Microarray* basierte bioinformatische Charakterisierung von infizierten A549 Zellen

Auch wenn Zellkultursysteme niemals die physiologischen Bedingungen eines Organismus widerspiegeln können, ermöglichen sie oft wertvolle Einblicke in die molekularen Abläufe biologischer Prozesse. In den initialen Experimenten dieser Arbeit wurde darauf geachtet, Zellen zu verwenden, die den physiologischen Bedingungen möglichst nahe kommen. Daher wurden zunächst A549 Zellen verwendet, bei denen es sich um alveolare epitheliale Adenocarcinomzellen handelt. Anhand von RT-qPCR Experimenten wurde deren Infizierbarkeit validiert, wobei zusätzlich gezeigt werden konnte, dass es im Verlauf der Infektion zu späten Zeitpunkten zu einer sehr schwachen Genaktivierung des Interleukins *IL6* und des Chemokins *IL8* kommt (Abbildung 7). Ein vergleichbares Ergebnis wurde für eine Infektion mit SARS-CoV in 2B4 Zellen und Calu-3 Zellen und MERS-CoV in Calu-3 Zellen beschrieben, sodass A549 Zellen ein repräsentatives Zellkultursystem darstellen (Yoshikawa, Hill et al. 2010; Lau, Lau et al. 2013).

Darüber hinaus wurde das im Rahmen dieser Arbeit verwendete HCoV-229E in HuH7 Zellen propagiert. Es folgte keine Aufreinigung der Viren über einen Sucrosegradienten, da eine derartige Aufreinigung die Ausbeute an infektiösen Partikeln verringern kann (Nagano, Yagyu et al. 1989). Aufgrund dessen besteht allerdings die Möglichkeit, dass im Überstand enthaltene Wachstumsfaktoren sowie Zytokine und Chemokine ebenfalls Wirtszellantworten induzieren, die fälschlicherweise als HCoV-229E spezifisch interpretiert werden. Um die Experimente optimal zu kontrollieren, wurde daher für Kontrollproben Virusüberstand für fünf Minuten bei 56°C erhitzt. Dadurch werden die Virionen vollständig zerstört und man generiert eine Bedingung, in der die Effekte der Virussuspension getrennt von denen der Replikation erfasst werden können. Das auf diese Weise in A549 Zellen erhobene *microarray* Ergebnis zeigt sehr eindrücklich die Effizienz dieser Kontrolle, da beim Vergleich von für 48 Stunden infizierten Zellen mit unbehandelten Zellen 239 Gene als dereguliert ermittelt werden konnten. Demgegenüber sinkt diese Zahl auf 37, wenn man als Kontrolle die Expressionsdaten der Zellen verwendet, die mit hitzeinaktiviertem Virusüberstand behandelt wurden (Abbildung 8).

In der initialen *microarray* Studie konnten 37 deregulierte Gene ermittelt werden, die eine Anreicherung für proinflammatorische Prozesse zeigten. Darüber hinaus konnte validiert werden, dass es im Rahmen einer HCoV-229E Infektion zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges kommt, die deutlich dominanter war (Abbildung 9). Die Aktivierung dieses Signalweges wurde bereits für verschiedene Coronaviren wie MHV und SARS-CoV experimentell gezeigt. Überraschenderweise wurde dies aber in keiner der für diese Viren publizierten *microarray* Studien validiert (Cong, Liu et al. 2013; Sims, Tilton et al. 2013; Chatterjee, Addya et al. 2014; Fung and Liu 2014). Im Fall von MHV ist dieses Ergebnis plausibel, da die Publikationen, die die MHV abhängige ER Stress Aktivierung näher charakterisieren, zeigen, dass es zu keiner verstärkten Expression der terminalen Zielgene kommt, was darauf hindeutet, dass zwar die initialen ER Stress Sensoren aktiviert werden,

das Virus aber an einem späteren Schritt der Signalkaskade die weitere Signalfortpflanzung über einen unbekannten Mechanismus blockiert (Bechill, Chen et al. 2008). Für SARS-CoV wurde gezeigt, dass es die Aktivierung der IRE1 und ATF6 Sensoren blockiert, aber nicht die von PERK. Dementsprechend könnte es sein, dass die PERK Aktivierung allein nicht ausreicht, um in *microarrays* mit SARS-CoV eine signifikante Anreicherungen der Geneexpression von ER Stress Zielgenen zu messen. Tatsächlich konnte in drei *microarray* Studien, in denen humane Zelllinien mit SARS-CoV infiziert wurden, konsistent eine transkriptionelle Induktion des Genes *ATF3* nachgewiesen werden, wobei dies in einer der Studien auch für das *ATF4* Gen gilt (Tang, Chan et al. 2005; Yoshikawa, Hill et al. 2010; Sims, Tilton et al. 2013). Da beide Transkriptionsfaktoren PERK abhängig aktiviert werden, sind diese Ergebnisse miteinander kompatibel.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass es auch im Rahmen einer HCoV-229E Infektion zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges kommt. Dabei fällt auf, dass ähnlich wie durch eine SARS-CoV Infektion hauptsächlich die PERK abhängige Achse des ER Stress Signalweges aktiviert wird (Abbildung 9). Dies konnte in dieser Arbeit auch direkt anhand der eIF2a Phosphorylierung und der induzierten *ATF3* Translation nachgewiesen werden (Abbildung 23). Weder die Prozessierung der *XBPI* mRNA noch die Spaltung des ATF6 Rezeptors wurden direkt nachgewiesen, sodass keine endgültige Aussage zur Aktivierung der anderen beiden Achsen des ER Stress Signalweges gemacht werden kann. Allerdings kommt es zu einer schwachen Induktion der *XBPI* mRNA (1-fach (\log_2)) in HuH7 Zellen, was allerdings nur ein indirektes Indiz für eine Aktivierung darstellt (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz konnte in A549 Zellen ein robust regulierter Satz an möglicherweise PERK abhängig regulierten Genen nachgewiesen werden, deren Funktionen für die erfolgreiche Replikation des HCoV-229E bisher unbekannt sind. Darüber hinaus konnte über einen LMD Ansatz gezeigt werden, dass sich die Expression dieser Gene auf infizierte Zellen beschränkt. Entgegen den Erwartungen, kommt es in Zellen, die sich neben den infizierten Zellen befinden, zu keinen nennenswerten Änderungen der Genexpression. Als erster antiviraler Mechanismus wird in infizierten Zellen normalerweise eine Interferonantwort ausgelöst (Kindler, Thiel et al. 2016). Die dadurch ausgeschütteten Interferone modulieren die Genexpression umliegender Zellen, sodass diese bereits vor der Infektion einen antiviralen Zustand einnehmen, was eine schnelle Ausbreitung der Infektion behindert. Viele Viren haben im Laufe ihrer Evolution Wege entwickelt, das Interferonsystem zu unterdrücken (Garcia-Sastre 2017) und auch die hier vorgestellten Daten zeigen keine nennenswerte Induktion der Expression von *interferon stimulated genes* (ISGs). Daher scheint auch das HCoV-229E Wege evolviert zu haben, um die Interferonantwort zu unterdrücken was bereits für weitere Coronaviren nachgewiesen wurde. Das SARS-CoV und das MERS-CoV beispielsweise sind in der Lage aktiv *TNF receptor associated factor 3* (TRAF3) zu blockieren, was zu einer verringerten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *interferon regulatory factor 3* (IRF3) führt, wohingegen das PEDV direkt die IRF3 Phosphorylierung behindert und damit die Interferonantwort blockiert (Kindler, Thiel et al. 2016; Wong, Lui et al. 2016; Zhang and Yoo 2016; Zhu, Wang et al. 2017).

Nichtsdestotrotz kommt es im Laufe der Infektion zur Expressionsinduktion von proinflammatorischen Interleukinen wie *IL8* und *IL6*, die allerdings verglichen mit dem potentiell erreichbaren Level (zum Beispiel durch IL-1) eher schwach ausfällt. In HuH7 Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine einstündige IL-1a Stimulation die Genexpression beider Gene ca. viermal stärker induziert als eine 24 stündige HCoV-229E Infektion. In A549 Zellen, die für 3 Stunden mit IL-1a stimuliert wurden, war dieser Effekt sogar noch höher. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es durch die HCoV-229E Infektion zu einer transkriptionellen Induktion von Genen kommt, die in direktem Zusammenhang mit der Inhibition von proinflammatorischen Genen stehen, was möglicherweise die verhältnismäßig schwache HCoV-229E abhängige Induktion der Interleukingene erklärt (Abbildung 13). Dazu zählen vor allem TNFAIP3 (auch A20), ZC3H12A und DUSP1. Neu gebildetes TNFAIP3 deubiquitiniert TRAF6, um die IL-1 abhängige Induktion des proinflammatorischen Signalweges wieder zu deaktivieren (Bannon, Zhang et al. 2015). ZC3H12A ist eine Ribonuklease, die spezifisch die mRNA des *IL6* Genes degradiert (Matsushita, Takeuchi et al. 2009). Bei DUSP1 handelt es sich um die Phosphatase, die p38 und weitere MAP Kinasen am spezifischen Threonin/Tyrosin Motiv dephosphoryliert (Liu, Gore et al. 2014). Da das HCoV-229E wahrscheinlich bereits im 18. Jahrhundert auf den Menschen als Wirt übersprang, konnte es sich in über 200 Jahren an seinen neuen Wirt adaptieren, was es gemessen an der völlig fehlenden Interferonantwort in A549 und HuH7 Zellen offenbar auch sehr effizient getan hat (Graham, Donaldson et al. 2013). Daher ist es wahrscheinlich, dass die nachgewiesene gedämpfte Aktivierung des proinflammatorischen Signalweges eine provirale Funktion hat. Andernfalls hätte das Virus einen Weg evolviert, diese Aktivierung vollständig zu blockieren. Für die pathologischen humanen Coronaviren SARS-CoV und MERS-CoV konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie eine proinflammatorische Reaktion induzieren, die allerdings verglichen mit HCoV-229E je nach Zielgen stärker oder schwächer ausfällt (Yoshikawa, Hill et al. 2010; Lau, Lau et al. 2013). Daher ist es wahrscheinlich, dass die pathophysiologischen Coronaviren durch die fehlende evolutionäre Anpassung an den Menschen noch nicht die „richtige“ Balance zwischen der Aktivierung und der Hemmung des proinflammatorischen Signalweges gefunden haben. Darüber hinaus verdeutlicht diese Betrachtungsweise, dass eine schwache Aktivierung des proinflammatorischen Signalweges einen konservierten Mechanismus unter Coronaviren darzustellen scheint.

6.1.2 Weiterführende *microarray* basierte bioinformatische Charakterisierung von infizierten HuH7 Zellen

Mit den LMD basierten *microarray* Experimenten in A549 Zellen konnte sehr detailliert aufgeklärt werden, welche Regulationen HCoV-229E auf Ebene des Transkriptoms induziert. Dieses Experiment

rekapituliert dabei aber eine sich langsam lateral ausbreitende Infektion, sodass eine Mischpopulation aus Zellen betrachtet wird, die für unterschiedliche Zeitspannen infiziert waren (Abbildung 8 und Abbildung 12). Um die Quantität der Expressionsänderungen zu einem definierten Zeitpunkt zu ermitteln, wurden weitere *microarray* basierte Analysen in HuH7 Zellen durchgeführt. Ein Vergleich mit den vorher erhobenen Daten zeigte, dass in HuH7 Zellen ein vergleichbarer Satz an Genen durch die Infektion dereguliert wird (Abbildung 17). Außerdem bestätigten sich die bioinformatisch erhobenen Ergebnisse der Experimente, die in A549 Zellen durchgeführt wurden. Darüber hinaus zeigte die bioinformatische Analyse, dass es neben der Aktivierung des proinflammatorischen - und des ER Stress Signalweges zu einer Reprimierung auf Ebene der mitochondrialen Atmungskette kommt (Abbildung 18 und Abbildung 19). Ein solcher Zusammenhang wurde bisher für kein Coronavirus nachgewiesen. In *Drosophila melanogaster* konnte allerdings nachgewiesen werden, dass eine Stimulation des ER Stress Signalweges durch das reduzierende Agens Dithiothreitol (DTT) zu einem vergleichbaren Effekt führt, wobei dieser unabhängig von der IRE1 Achse induziert wird (Lee, Oney et al. 2015). Dies impliziert, dass die beobachteten Veränderungen an der Atmungskette eine Folge der Aktivierung des ER Stress Signalweges sind. Im Rahmen dieses Signalweges werden zunächst Prozesse aktiviert, die die Homöostase im ER wieder herstellen sollen. Eine dauerhafte Aktivierung führt allerdings zu einer BCL-2 abhängigen Einleitung der Apoptose. Dabei kommt es zur Auflösung der äußeren mitochondrialen Membran. Das freiwerdende Cytochrom-c fungiert dann als ultimativer Apoptosemediator (Pena-Blanco and Garcia-Saez 2017). Es ist unklar, ob die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen an der mitochondrialen Atmungskette mit einer Einleitung der Apoptose in Zusammenhang stehen. In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass auch eine Fehlfunktion in Mitochondrien oder die Hemmung einzelner Komplexe der Atmungskette zu einer differenziellen Aktivierung des PERK abhängigen ER Stress Signalweges führen können, was zeigt, dass die Kommunikation zwischen Mitochondrien und dem ER in beide Richtungen ablaufen kann. Dies impliziert, dass es deutlich mehr Kommunikationsmechanismen zwischen beiden Organellen gibt, als nur den klassischen apoptotischen Signalweg (Bouman, Schlierf et al. 2011; Munoz, Ivanova et al. 2013; Liu, Huang et al. 2017). Darüber hinaus wird die BCL-2 vermittelte Apoptose über einen Cytochrom-c:IRE1:JNK Signalweg und nicht direkt über die PERK Achse des ER Stress Signalweges eingeleitet (Ogata, Hino et al. 2006). Da es im Rahmen der HCoV-229E Infektion primär zu einer PERK Aktivierung kommt, spricht dies dafür, dass die beobachteten Veränderungen an der mitochondrialen Atmungskette keine Folge einer beginnenden Apoptose sind. Nichtsdestotrotz konnte auch eine beginnende JNK Phosphorylierung nachgewiesen werden, was für apoptosebedingte Veränderungen spricht. Es bleibt daher ungeklärt, ob die beobachteten PERK abhängigen HCoV-229E induzierten mitochondrialen Veränderungen eine pro- oder antivirale Funktion haben und ob sie in Zusammenhang mit einer später aktivierten Apoptose stehen. Von der Tatsache ausgehend, dass die Gene der Atmungskette reprimiert werden, könnte man zur Klärung dieser Frage die Komplexe I und III der Atmungskette mit den Inhibitoren Myxothiazol (Thierbach and Reichenbach 1981) und

Piericidin A (Hall, Wu et al. 1966) hemmen, um anschließend die Auswirkung auf die virale Replikation zu untersuchen. Eine solche Untersuchung wurde bisher nicht durchgeführt und könnte einen detaillierteren Einblick in die Relevanz der Atmungskette für die HCoV-229E Replikation gewähren.

Darüber hinaus konnte anhand der bioinformatischen Analyse in HuH7 Zellen gezeigt werden, dass es zu einer transkriptionellen Induktion von Genen kommt, deren Produkte für die Bindung von Polymerase II regulierten Promotoren und Genen relevant sind (Abbildung 18 und Abbildung 19). Eine detailliertere Sichtung der Daten ergab, dass es sich dabei primär um Transkriptionsfaktoren handelt (Daten nicht gezeigt). Dies ist wenig überraschend, da in dieser Arbeit sowohl in A549 - als auch in HuH7 Zellen gezeigt werden konnte, dass es im Rahmen der HCoV-229E Infektion zur Aktivierung des proinflammatorischen – und des ER Stress Signalweges kommt. Signalwege zeichnen sich generell dadurch aus, dass sie initial die Expression von Transkriptionsfaktoren aktivieren und sie posttranslational modifizieren, was wiederum die Expression weiterer Faktoren induzieren. Dementsprechend können die Expressionsänderungen dieser Transkriptionsfaktoren als Signatur der induzierten Signalwege gesehen werden. Unklar ist, ob die verstärkte Transkription auch zu einer verstärkten Translation der mRNAs führt, da diese durch die PERK abhängige globale Translationsinhibition behindert werden könnte. Tatsächlich wurde allerdings die Translation von drei Transkriptionsfaktoren in dieser Arbeit auf Ebene der Proteinabundanz untersucht (ATF3, JUN, KLF6) und es konnte gezeigt werden, dass diese tatsächlich verstärkt translatiert werden (Abbildung 23). Dementsprechend scheinen diese Transkripte, und wahrscheinlich viele weitere, in der Lage zu sein die ribosomale Translationsinhibition zu umgehen. Gleiches gilt für virale Transkripte, die ebenfalls translatiert werden. Der zugrunde liegende Mechanismus dieses selektiven Einflusses der Virusreplikation auf die Translation ist allerdings bis heute unbekannt (Nakagawa, Lokugamage et al. 2016).

6.1.3 Charakterisierung des proinflammatorischen NF- κ B Signalweges und dessen Relevanz für die HCoV-229E Replikation

In A549 Zellen wurde bereits gezeigt, dass das HCoV-229E den proinflammatorischen Signalweg partiell aktiviert. Da dies ein konservierter Mechanismus unter Coronaviren zu sein scheint, wurde die Genexpressionsänderungen nach einer IL-1 α Stimulation und einer HCoV-229E Infektion in HuH7 Zellen miteinander verglichen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das HCoV-229E tatsächlich einen Teil des proinflammatorischen Signalweges aktiviert, wobei sich allerdings die Anzahl und die Expressionslevel der induzierten Gene von einer IL-1 α Stimulation deutlich unterscheiden (Abbildung 20 und Abbildung 21). Außerdem verdeutlichte diese Analyse, dass der erheblich größere Teil der HCoV-229E regulierten Gene nicht in direktem Zusammenhang mit dem proinflammatorischen,

sondern mit dem ER Stress Signalweg steht (Abbildung 22). Nichtsdestotrotz validiert diese Analyse die gedämpfte Natur der HCoV-229E Induktion des proinflammatorischen Signalweges und führte zu der Frage, inwieweit relevante Signalwegproteine direkt durch die HCoV-229E Infektion moduliert werden. *Westernblot* Analysen offenbarten, dass es im Rahmen der Infektion zur Phosphorylierung der klassischen MAP Kinasen JNK und p38 kommt, wobei sich deren maximale Aktivierung zu den untersuchten Zeitpunkten nur marginal von einer IL-1 α Stimulation unterscheidet (Abbildung 23). Vor allem die JNK Aktivierung mit der daraus resultierenden Aktivierung der Transkriptionsfaktoren JUN und FOS zeigt, dass AP-1 Transkriptionsfaktoren im Verlauf der Infektion an der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen beteiligt sein müssen. Dies scheint darüber hinaus ein konservierter Mechanismus unter Coronaviren zu sein, da eine JNK Aktivierung auch im Rahmen einer SARS-CoV, MHV und IBV Infektion nachgewiesen wurde (Banerjee, Narayanan et al. 2002; Fung, Liao et al. 2014). Die Phosphorylierung von JNK ist dabei allerdings kein direkter Beweis für eine Aktivierung des proinflammatorischen Signalweges. JNK Phosphorylierungen können unter anderem durch UV-Licht, osmotischen Stress, einen Hitzeschock, oxidativer Stress, Proteinsyntheseinhibitoren wie Anisomycin oder Cycloheximid und Zytostatika wie Cis-Platin induziert werden, wobei sich die Kinetik der Aktivierung je nach Stimulus verschieden ausprägen kann (Kyriakis and Avruch 2001). Die hier beobachtete langsam stärker werdende JNK Phosphorylierung ist eher mit einer Zytostatika Stimulation vergleichbar, was dafür spricht, dass die JNK Aktivierung im HCoV-229E Kontext apoptotischer Natur ist. Dies wäre auch damit vereinbar, dass HuH7 Zellen im weiteren Verlauf der Infektion bis zum 48 Stunden Zeitpunkt deutliche zytopathische Effekte aufweisen und ihre Adhärenz verlieren (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz führte die Hemmung von JNK mittels des spezifischen Inhibitors SP600125 zu einer verringerten viralen Replikation, was impliziert, dass die JNK Phosphorylierung eine provirale Funktion hat (Abbildung 32). Der gleiche Effekt konnte auch für das SARS-CoV gezeigt werden, sodass dieser Mechanismus für die Replikation aller Coronaviren relevant zu sein scheint (Mizutani, Fukushi et al. 2005). Um die Funktion von JNK im Rahmen der Infektion weiter zu untersuchen, könnten Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt werden, die zeigen, ob es zu einer zytoplasmatischen Umverteilung von JNK kommt. Möglicherweise offenbart dies, dass JNK spezifisch an die viralen RTCs rekrutiert wird. Außerdem könnten unvoreingenommene *yeast-to-hybrid-screenings* zeigen, ob JNK direkt mit viralen Proteinen interagiert, oder über welchen zellulären Mechanismus es aktiviert wird.

Auch die p38 Aktivierung konnte bereits für SARS-CoV, MHV und IBV gezeigt werden, wobei am Beispiel von IBV außerdem nachgewiesen werden konnte, dass dessen Aktivierung mit der Expressionsinduktion der Gene *IL6* und *IL8* in Verbindung steht, da die RNAi basierte Depletion von p38 die Expressionsinduktion beider Gene verringerte (Banerjee, Narayanan et al. 2002; Mizutani, Fukushi et al. 2004; Liao, Wang et al. 2011). Ohne p38 konnte außerdem eine verminderte Virusreplikation festgestellt werden, sodass auch diese MAP Kinase eine essentielle Funktion im Replikationszyklus von Coronaviren zu haben scheint. Auch in der hier präsentierten Arbeit konnte

die p38 Phosphorylierung nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur JNK Inhibition veränderte die Inhibition von p38 mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 die Replikationsrate des HCoV-229E nicht. Da ein solcher Effekt anhand des *knockdowns* beim IBV gezeigt wurde, besteht die Möglichkeit, dass p38 nicht über seine Kinaseaktivität, sondern über eine andere bisher unbekannte Funktion die Replikation von Coronaviren fördert. Darüber hinaus könnte es sich bei der beobachteten Diskrepanz aber auch um virusspezifische oder zelltypspezifische Effekte handeln. Auch für p38 könnten weiterführende Experimente auf Basis von Immunfluoreszenzfärbungen oder unvoreingenommenen *yeast-to-hybrid-screenings* dazu beitragen, einen detaillierteren Einblick in die Funktion dieser MAP Kinase im Rahmen einer HCoV-229E Infektion zu generieren. Die Ergebnisse könnten anschließend über Protein:Protein Interaktionsexperimente validiert werden.

Die drastischsten Unterschiede zwischen einer IL-1 α Stimulation und einer HCoV-229E Infektion konnten allerdings im NF- κ B Signalweg nachgewiesen werden. Im Verlauf der Infektion kommt es zu einer langsam abnehmenden Menge des NF- κ B Inhibitors I κ B α , die nicht mit dessen messbarer Phosphorylierung einhergeht. In Folge dessen kommt es zu einer partiellen Translokation von p65 in den Zellkern, wo dieser Transkriptionsfaktor an eine Vielzahl von Promotoren und *enhancern* bindet (Dissertation Sascha Wittig, AG Kracht)(Poppe, Wittig et al. 2017). Dabei kommt es gleichzeitig zu einer Verminderung der Phosphorylierung an Serin 536. Der Transkriptionsfaktor p65 kann an einer Vielzahl von Aminosäuren modifiziert werden, wobei diese posttranslationalen Modifikationen determinieren, an welche genetischen Elemente er bindet und wie er die Expression der entsprechenden Gene beeinflusst. Speziell die Phosphorylierung von Serin 536 moduliert die Elongationskontrolle von p65 (Diamant and Dikstein 2013). Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kracht konnten bestätigen, dass p65 nicht nur HCoV-229E induziert in den Kern transloziert, sondern dort auch spezifische genetische Elemente bindet, die nur zum Teil mit den unter IL-1 α gebundenen Elementen überlappen (Dissertation Sascha Wittig, AG Kracht)(Poppe, Wittig et al. 2017).

Der Mechanismus über den I κ B α abgebaut wird, um p65 freizusetzen ist bisher unbekannt. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die PERK vermittelte Hemmung der ribosomalen Translation dabei eine essentielle Rolle spielt. Tatsächlich konnten eine Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Induktion des ER Stress Signalweges durch DTT oder Thapsigargin zu einer Verringerung der Abundanz von I κ B α führt (Tam, Mercado et al. 2012). In dieser Studie konnten die Autoren zeigen, dass dieser Prozess über eine IKK vermittelte Phosphorylierung von I κ B α an den Serinen 32 und 36 induziert wird, indem sie das Proteasom mit dem spezifischen Inhibitor MG132 (Rock, Gramm et al. 1994) hemmten. Dies impliziert, dass es sich bei dem beobachteten I κ B α Abbau um einen aktiv gesteuerten Prozess handelt. Ähnliche Versuche der Arbeitsgruppe Kracht in Kombination mit einer Coronavirusinfektion konnte dies bestätigen. Außerdem konnte die HCoV-229E Replikation mit dem IKK Inhibitor PHA-408 (Mbalaviele, Sommers et al. 2009) gehemmt werden, was zusätzlich die Annahme unterstützt, dass der I κ B α Abbau IKK vermittelt eingeleitet wird (Dissertation Sascha Wittig, AG Kracht)(Poppe, Wittig et al. 2017).

Überraschenderweise konnte auch beobachtet werden, dass es im Verlauf der HCoV-229E Infektion zu einem Abbau der IKK Untereinheiten IKKB und NEMO kommt. Dies kann nicht über die Aktivierung des ER Stress Signalweges induziert werden, da bereits gezeigt wurde, dass die IKK Level unter diesen Bedingungen konstant bleiben (Tam, Mercado et al. 2012). Dies wirft allerdings die Frage auf, in wie weit der IKK Komplex in der Lage ist, den Abbau von I κ B α einzuleiten, wenn seine Untereinheiten degradiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der I κ B α Abbau ohne die Rupturierung des IKK Komplexes deutlich schneller verlaufen würde, was eine frühere und stärkere Aktivierung von NF- κ B Zielgenen zur Folge hätte. Dies wiederum könnte mit der Expression antiviraler Faktoren einhergehen, sodass Coronaviren einen Mechanismus entwickelt haben, um den I κ B α Abbau zu bremsen, aber nicht völlig zu verhindern. Tatsächlich konnte erst kürzlich am Beispiel des *porcine deltacoronavirus* (PDCoV) gezeigt werden, dass dessen Strukturprotein NSP5 in der Lage ist, NEMO proteolytisch zu spalten (Zhu, Fang et al. 2017). Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein *knockdown* des starken proinflammatorischen Repressors TNFAIP3 die Replikation des HCoV-229E deutlich vermindert. Dadurch kommt es zu einer verstärkten basalen Expression von Interleukinen und anderen NF- κ B abhängig exprimierten Faktoren, zu denen höchstwahrscheinlich auch Interferone gehören, was bestätigt, dass durch eine zu starke Aktivierung proinflammatorischer Prozesse in der Zelle die antiviralen Effekte überwiegen. Blockiert man allerdings die Aktivierung proinflammatorischer Prozesse durch eine Depletion von p65 oder eine Inhibition von JNK beziehungsweise IKK, können Coronaviren offensichtlich das provirale Potential einer schwachen Aktivierung des proinflammatorischen Signalweges nicht mehr nutzen. Damit rekapitulieren die in HeLa und HuH7 Zellen erhobenen Daten die vorherigen Befunde in A549 Zellen. Da sich Viren durch ihre hohe Mutationsrate sehr schnell und effizient an ihren Wirt anpassen, ist es nicht verwunderlich, dass sie einen Weg gefunden haben, die für ihre Replikation perfekte Balance zwischen Aktivierung und Hemmung dieses Signalweges zu wahren. Aus dem gleichen Grund stellen allerdings auch zoonotische Formen wie SARS-CoV und MERS-CoV eine eminente Gefahr für infizierte Individuen dar, denn diese Viren hatten durch den erst kürzlich erfolgten Wirtswechsel keine Zeit diese Balance im neuen Wirt zu finden, was sich in den hohen Mortalitätsraten von bis zu 50% äußert (Graham, Donaldson et al. 2013).

6.2 Identifizierung HCoV-229E spezifisch deregulierter Proteine auf Ebene des Proteoms und der posttranslationalen Modifikationen

Obwohl die *microarray* Analysen bereits einen sehr detaillierten Einblick in die HCoV-229E abhängig deregulierten zellulären Prozesse gewährten, wurden außerdem Proteomanalysen auf Basis von markierungsfreier Massenspektrometrie durchgeführt. Vor allem da es im Verlauf einer

Coronaviruserkrankung zu einer PERK abhängigen ribosomalen Inhibition kommt, sollte dadurch geklärt werden, inwieweit die beobachteten Expressionsänderungen auf Ebene des Transkriptoms auch auf Ebene des Proteoms umgesetzt werden. Außerdem wurden in diesem Experiment HCoV-229E induzierte Regulationen an Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen erfasst. Dabei werden Acetylierungen und Phosphorylierungen direkt nachgewiesen. Ubiquitinierungen können jedoch nur indirekt über das K-ε-GG Motiv nachgewiesen werden, sodass nur das initiale Akzeptorlysin nachgewiesen wird, was aber keine Information über die Natur der potentiell verknüpften Ubiquitinkette liefert. Außerdem muss erwähnt werden, dass dieses Motiv nicht solitär repräsentativ für eine Ubiquitinierung ist. Auch andere Proteine der Ubiquitinfamilie, wie Sumo, hinterlassen nach einem tryptischen Verdau dieses Motiv. Es ist jedoch allgemein akzeptiert, diese Modifikationen als Nachweis für eine Ubiquitinierung zu interpretieren (Ordureau, Munch et al. 2015).

6.2.1 Analyse posttranslationaler Modifikationen an viralen Proteinen

Überraschenderweise offenbarte die markierungsfreie massenspektrometrische Analyse von HCoV-229E infizierten HuH7 Zellen, dass insgesamt neun virale Proteine posttranslationale Modifikationen tragen. Dieser Befund stellt ein absolutes Novum im Bereich der Coronaviruserkrankung dar und erweitert damit potentielle antivirale Strategien um eine neue Ebene. Der Großteil der nachgewiesenen Modifikationen umfasst dabei Ubiquitinierungen, wobei diese am frequentesten an den Proteinen NSP2, dem S Protein und dem N Protein nachweisbar sind. Da das S Protein ein dominanter Faktor für die Aktivierung des ER Stress Signalweges darstellt und damit toxisch für die Zelle ist, ist es denkbar, dass die Wirtszelle versucht, dieses über K48 verknüpfte Ubiquitinketten abzubauen (Chan, Siu et al. 2006; Versteeg, van de Nes et al. 2007). Dies würde die starke Ubiquitinierung des S Proteins erklären. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die *papain-like protease* (NSP3) nicht nur an der proteolytischen Spaltung der viralen pp1a und pp1ab beteiligt ist, sondern auch spezifische K48 verknüpfte Ubiquitinketten abbaut (Bekes, van der Heden van Noort et al. 2016). Da mit dem hier verwendeten Ansatz allerdings nicht die Natur der Ubiquitinketten aufgeklärt werden kann, könnte es auch durchaus sein, dass es sich um regulatorisches Monoubiquitin oder Ubiquitinpolymere handelt.

Auch für NSP2 konnte eine deutliche Ubiquitinierung an verschiedenen Akzeptorlysinen nachgewiesen werden. Da virale Proteine generell in einer überdurchschnittlichen Abundanz in der Zelle vorkommen, ist es denkbar, dass sie alle in geringem Maß durch Ubiquitinligasen modifiziert werden. Da aber die NSPs 1-11 durch proteolytischen Verdau entstehen, kommen sie in der Wirtszelle auch in der gleichen Stöchiometrie vor, was ausschließt, dass es sich bei den dominanteren NSP2 Ubiquitinierungen um einen derartigen „Hintergrund“ handelt. Die Funktion von NSP2 ist, obwohl

Kristallstrukturen existieren, bisher unbekannt (Li, Ren et al. 2011; Yu, Ming et al. 2012). Es konnte allerdings über einen unvoreingenommenen Ansatz nachgewiesen werden, dass NSP2 mit den Wirtsproteinen *prohibitin 1* und 2 (PHB1 und 2) interagiert (Cornillez-Ty, Liao et al. 2009). Diese wiederum fungieren als Strukturproteine und organisieren die Membranstrukturen in Mitochondrien (Ikon and Ryan 2017). Dementsprechend könnte NSP2 direkt mit der Modulierung von mitochondrialen Prozessen in infizierten Zellen in Verbindung stehen, die bereits in Kapitel 6.1.2 diskutiert wurde. Für diesen Prozess könnten regulatorische Ubiquitinketten von Nöten sein. Darüber hinaus könnten die Ubiquitinierungen auch K48 verknüpft NSP2 für eine Degradation markieren, was eine besondere Relevanz dieses Proteins impliziert. Da bereits gezeigt wurde, dass MHV und SARS-CoV Mutanten, denen NSP2 komplett fehlt, sich weiterhin im Zellkultursystem replizieren, scheint es keine Relevanz für die Replikation selbst zu haben (Graham, Sims et al. 2005). Dementsprechend ist es wahrscheinlicher, dass NSP2 eine modulatorische Funktion für Signalwege hat und in diesem Kontext ubiquitiniert wird.

Das am stärksten modifizierte HCoV-229E Protein ist das N Protein, welches eine Vielzahl von Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen trägt. Generell wurden Acetylierungen an Coronavirusproteinen nach aktuellem Kenntnisstand noch nie nachgewiesen. Über deren Funktion kann daher nur spekuliert werden, aber es ist denkbar, dass diese Modifikationen die Interaktionen mit Wirtsproteinen regulieren. Darüber hinaus könnten diese Modifikationen nur in bestimmten Organellen vorkommen. Für das N Protein konnte gezeigt werden, dass es nicht nur im Zytoplasma vorkommt, sondern auch in den Zellkern transloziert und direkt an Chromatin bindet (Dissertation Sascha Wittig, AG Kracht)(Poppe, Wittig et al. 2017). Möglicherweise findet die Acetylierung nur im Zellkern statt, da vor allem dort sehr viele Acetyltransferasen lokalisieren, die an der Regulation von Histonacetylierungen beteiligt sind. Dies könnte über einen spezifischen Antikörper gerichtet gegen acetyliertes N Protein nachgewiesen werden, der allerdings bisher nicht existiert. Genau wie für Acetylierungen, ist auch der Nachweis von Ubiquitinierungen am N Protein ein Novum in der Coronavirusforschung. Da es sich beim N Protein um das abundanteste virale Protein handelt, ist es auch hier denkbar, dass die Ubiquitinierungen K48 verknüpft als Markierung für den proteasomalen Abbau dienen. Die Zelle könnte in der Lage sein, diese Proteine als zellfremd wahrzunehmen und es dementsprechend zu degradieren. Darüber hinaus könnten die angefügten Ubiquitine aber auch eine regulatorische Funktion haben, die unter Umständen ebenfalls an die intrazelluläre Lokalisation des N Proteins gebunden ist.

Im Gegensatz zur Acetylierung und Ubiquitinierung konnte die Phosphorylierung des N Protein bereits 1983 am Beispiel von ektopisch exprimiertem N Protein des MHV nachgewiesen werden (Stohlman, Fleming et al. 1983). Dabei scheint die Phosphorylierung der serinreichen Domäne über alle Coronaviren konserviert zu sein. Dieser Befund konnte später für weitere Coronaviren auf Basis von infizierten Zellen validiert werden. Außerdem wurden dabei Evidenzen generiert, die zeigen, dass die Phosphorylierung dieser Domäne auf zelluläre Kompartimenten beschränkt ist (Calvo, Escors et al.

2005; White, Yi et al. 2007; Peng, Lee et al. 2008). Darüber hinaus konnte die Wirtskinase *glycogen synthase kinase-3* (GSK-3) als eine der Kinasen identifiziert werden, die für die Phosphorylierung der serinreichen Domäne verantwortlich ist (Wu, Yeh et al. 2009). Neben der serinreichen Domäne konnten verschiedene weitere Aminosäuren des N Proteins identifiziert werden, die Phosphorylierungen tragen können (Calvo, Escors et al. 2005; Chen, Gill et al. 2005; White, Yi et al. 2007). Die Bedeutung dieser Phosphorylierungen, sowie deren Relevanz für die Pathogenität sind allerdings vollkommen unverstanden. In diesem Punkt erweitern die in dieser Arbeit erhobenen Daten das Bild um ein Vielfaches. Die Phosphorylierung des HCoV-229E N Protein konnte sowohl in der serinreichen Domäne, als auch im C-Terminus, sowie in weiteren Bereichen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der C-Terminus PERK abhängig phosphoryliert wird. Dabei ist unklar, ob PERK selbst die Kinase darstellt, oder ob eine potentielle distal von PERK aktivierte Kinase für diesen Prozess verantwortlich ist (Abbildung 31). JNK kann dabei höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da deren inhibitorbasierte Hemmung nur zu einer schwachen Hemmung der Phosphorylierung des N Proteins führt. Überraschenderweise führte eine Hemmung der p38 MAP Kinase zu einer verstärkten HCoV-229E induzierten Phosphorylierung von JNK und vom C-Terminus des N Proteins (Abbildung 32). Dies impliziert, dass möglicherweise p38 abhängig eine Phosphatase aktiviert wird, die Phosphorylierungen an beiden Proteinen hydrolysiert. Ein potentieller Kandidat wäre die Phosphatase DUSP1, deren starke transkriptionelle Expression sowohl in A549 als auch in HuH7 Zellen HCoV-229E abhängig nachgewiesen wurde und für die beschrieben ist, dass sie MAP Kinasen wie JNK und p38 dephosphoryliert (Abbildung 32 und Abbildung 17)(Liu, Gore et al. 2014). Entsprechende Interaktionsstudien wie Ko-Immunpräzipitationen könnte diese Vermutung beweisen.

6.2.2 Analyse posttranslationaler Modifikationen an Wirtspoteinen

Neben den viralen Proteinen und deren posttranslationalen Modifikationen konnten durch die markierungsfreie massenspektrometrische Analyse mehrere tausend Peptide nachgewiesen werden, die Wirtspoteinen und deren posttranslationale Modifikationen repräsentieren (Abbildung 33). Diese Peptide wiederum repräsentieren hunderte bis tausende Proteine auf Ebene der *entrez Gene ID* und bilden damit zum ersten Mal ein Gesamtbild von posttranslationalen Modifikationen in HuH7 Zellen ab (aktuelle Daten www.phosphosite.org). Darüber hinaus konnte durch quantitative Analysen nachgewiesen werden, dass es an einer Vielzahl von Proteinen im Rahmen der HCoV-229E Infektion zu Deregulierungen dieser posttranslationalen Modifikationen kommt. Dabei konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass der Großteil der deregulierten Acetylierungen und Ubiquitinierungen nach einer 12 stündigen Infektion ihr Maximum erreichten, während dies für deregulierte Phosphorylierungen nach 24 Stunden der Fall war (Abbildung 34). Für die

Ubiquitinierungen könnte dies die Folge eines viralen Mechanismus sein. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ist es vorstellbar, dass die Wirtszelle in der Lage ist, die fremden viralen Proteine zu erkennen und über K48 verknüpfte Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau zu markieren. Da für die *papain-like protease* (NSP3) gezeigt wurde, dass sie in der Lage ist, diese Ubiquitinketten abzubauen, könnte es sein, dass diese Deubiquitinierung nicht nur an viralen, sondern auch an Wirtsproteinen stattfindet. Dies würde allerdings unterstellen, dass der Großteil der deregulierten Ubiquitinierungen an Wirtsproteinen K48 verknüpft ist, was sehr unwahrscheinlich ist. Außerdem könnten dadurch nur positive, aber nicht negative Regulationsänderungen erklärt werden (Abbildung 36B). Eine wahrscheinlichere Erklärung ist, dass das HCoV-229E im Rahmen der Infektion tatsächlich das globale Ubiquitinübertragungssystem stört. Am Beispiel der Ubiquitinierung an Histonen konnte gezeigt werden, dass es tatsächlich zu einer Vielzahl an Deregulationen an den zugehörigen E3 Ubiquitinligasen kommt, was diese Annahme unterstützt (Abbildung 36A unten). Außerdem konnte in präliminären eigenen Experimenten, in denen für 24 Stunden infizierte HeLa Zellen HIS markiertes Ubiquitin überexprimierten, gezeigt werden, dass nach einem *pulldown* des HIS markierten Ubiquitin die Gesamtmenge an präzipitierbaren Proteinen absinkt (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die initiale Beobachtung der markierungsfreien massenspektrometrischen Untersuchung in HCoV-229E infizierter HuH7 Zellen, dass es im Rahmen der Infektion zunächst zu starken Modulationen an Ubiquitinketten kommt (12 Stunden), die dann größtenteils wieder abgebaut werden (24 Stunden). Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Reihe von Proteinen, die an der Acetylierung von Histonen beteiligt sind im Rahmen der HCoV-229E Infektion posttranslational modifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass für Acetylierungen ein ähnlicher Mechanismus zum Tragen zu kommt (Abbildung 37).

Deregulierte Phosphorylierungen hingegen akkumulieren vor allem zum 24 Stunden Zeitpunkt, was mit den initialen *westernblot* Experimenten kompatibel ist (Abbildung 33C und D). Obwohl Phosphorylierungen in der Literatur zu den am besten charakterisierten posttranslationalen Modifikationen gehören, wurde bisher kaum eine der in dieser Arbeit nachgewiesenen Modifikationen im funktionellen Zusammenhang mit einer Coronavirusinfektion untersucht (Ardito, Giuliani et al. 2017). Um festzustellen, ob die Proteine, an denen deregulierte posttranslationale Modifikationen nachgewiesen wurden in einem funktionellen Zusammenhang stehen, wurden daher die Daten über einen Schwellenwert gefiltert und für ORA Analysen verwendet, wobei die drei untersuchten Modifikationen gemeinsam betrachtet wurden. Diese Analyse offenbarte eine Vielzahl von deregulierten Prozessen der drei GO Kategorien *biological process*, *cellular component* und *molecular function*, sowie von KEGG Signalwegen. Deren detaillierte Ausarbeitung würde weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, sodass einige interessante Beispiele für eine genauere Darstellung ausgesucht wurden.

Zu beiden Zeitpunkten konnte eine Anreicherung von deregulierten posttranslationalen Modifikationen an Proteinen der Kernpore nachgewiesen werden. Zu diesem Phänomen gibt es im

Bereich der Coronaviren kaum Literatur. Es ist zwar bekannt, dass das SARS-CoV über sein ORF6 Protein die Kerntranslokation des Interferon Aktivators STAT1 verhindert, aber dies wird dadurch vermittelt, dass eine der Untereinheiten, die das STAT1 Protein normalerweise in den Kern transportieren, am ER akkumuliert (Frieman, Yount et al. 2007). Dementsprechend steht dieser Mechanismus nicht in Zusammenhang mit Regulationen an der Kernpore. Nichtsdestotrotz gibt es verschiedene Möglichkeiten dieses Phänomen zu erklären. Zum einen kommt es in Folge der Infektion zu einer Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie p65 und ATF4, die in den Zellkern translozieren. Die nachgewiesenen Deregulierungen an der Kernpore können dementsprechend mit dem *shuttling* dieser Transkriptionsfaktoren in Verbindung stehen. Darüber hinaus muss neu synthetisierte mRNA nach der Transkription die Kernpore passieren, um im Zytoplasma translatiert zu werden. Auch dabei könnten die in dieser Arbeit nachgewiesenen Modifikationen der Kernpore eine Rolle spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch das virale N Protein im Zellkern nachweisbar ist, sodass es einen Mechanismus geben muss, über den dieses Protein die Kernpore passiert, der ebenfalls mit den nachgewiesenen Änderungen an posttranslationalen Modifikationen an Kernporenproteinen in Zusammenhang stehen könnte. Weiterhin ist es denkbar, dass verschiedene Proteine der Kernpore in Folge der Infektion ihre Lokalisation ändern. Ein solches Verhalten wurde für *nucleoporin 98* (NUP98) gezeigt, welches im Rahmen einer Hepatitis C Virus Infektion an virale Replikationskomplexe rekrutiert wird (Lussignol, Kopp et al. 2016). Während einer HIV Infektion kommt es zu einer Translokation von NUP98 und NUP214 in Nukleoli (Zolotukhin and Felber 1999) und im Rahmen einer *japanese encephalitis virus* Infektion wird die Expression des Kernporenproteins RANBP2 induziert (Zhang, Chai et al. 2013). Im Drosophila System konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass NUP98 als antiviraler Aktivator dienen kann, der direkt mit Transkriptionsfaktoren interagiert und auf diese Weise die antivirale Genantwort gegen RNA Viren (SINV, VSV) steuert (Panda, Gold et al. 2015). Damit scheint die Kernpore ein essentielles zelluläres Kompartiment für virale und antivirale Prozesse zu sein, sodass wahrscheinlich die meisten Viren Strategien entwickelt haben, um diese regulatorisch zu beeinflussen. Kaum eine Arbeit in der Literatur geht dabei auf posttranslationale Modifikationen ein, aber alle eben vorgestellten Proteine (NUP98, NUP214 und RANBP2) zeigten Coronavirus induzierte deregulierte posttranslationale Modifikationen zu mindestens einem Zeitpunkt. Dementsprechend könnte die weitere Untersuchung dieser Proteine Mechanismen aufklären, deren Blockade die virale Replikation hemmt.

Darüber hinaus offenbarte die markierungsfreie massenspektrometrische Analyse, dass eine Vielzahl von Proteinen deregulierte Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen tragen, die mit *P-bodies* und deren Synthese in Verbindung stehen (Abbildung 37A oben und Abbildung 38). Wie bereits in Kapitel 2.3.1 eingeleitet wurde, stellen *P-bodies* subzelluläre Strukturen dar, von denen bekannt ist, dass sie von vielen Viren aufgelöst wird, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen vielfältig sind. Zum einen degradieren Viren wie das Poliovirus aktiv *P-body* Komponenten (Dougherty, White et al.

2011). Anderen Viren wiederum induzieren eine Umverteilung von *P-Body* Proteinen in virale Replikationskomplexe oder andere zelluläre Organellen und lösen auf diese Weise *P-bodies* auf (Chahar, Chen et al. 2013; Bhowmick, Mukherjee et al. 2015). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *P-bodies* in infizierten Zellen ebenfalls aufgelöst werden, wobei dies nicht in Zusammenhang mit der Degradierung der Hauptproteine des *decapping*-Komplexes steht (Abbildung 40 und Abbildung 41). Prinzipiell ist es denkbar, dass eine weitere essentielle *P-body* Komponente direkt degradiert wird, da die viralen Proteine NSP3 und 5 proteolytische Funktionen haben. Kandidaten dafür wären PAN3 und LSM14A, für die gezeigt wurde, dass ein *knockdown* zur Auflösung der *P-bodies* führt (Zheng, Ezzeddine et al. 2008; Perez-Vilaro, Scheller et al. 2012). LSM14A wurde im Proteom Datensatz, der in dieser Arbeit erhoben wurde, identifiziert und zeigte keine deregulierte Abundanz (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz trägt LSM14A mehrere deregulierte Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen, sodass nicht auszuschließen ist, dass diese in direktem Zusammenhang mit der beobachteten Auflösung der *P-bodies* stehen (Abbildung 37A oben und Abbildung 38). PAN3 hingegen konnte in keinem Datensatz identifiziert werden und bleibt daher als potentieller Kandidat für einen viral induzierten Abbau bestehen. Darüber hinaus ist bekannt, dass EDC4 essentiell für die Aufrechterhaltung von *P-bodies* ist, da dessen *knockdown* ebenfalls zur Auflösung von *P-bodies* führt (Dissertation Ulas Tenekeci, AG Kracht)(Yu, Yang et al. 2005; Seto, Yoshida-Sugitani et al. 2015). In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass EDC4 nicht viral induziert abgebaut wird (Abbildung 40 und Abbildung 41). Dennoch kommt es zu einer negativen Regulation verschiedener Phosphorylierungen im Bereich der Aminosäuren 727 bis 741. EDC4 enthält eine WD40 Domäne (Aminosäuren 131 - 538) für die DCP1a Interaktion und eine α -helikale Domäne (Aminosäuren 974 - 1401) für die DCP2 und die XRN1 Interaktion. Zwischen diesen Domänen liegt ein flexibler *linker*, der an vielen Aminosäuren Phosphorylierungen tragen kann (Chang, Bercovich et al. 2014)(www.uniprot.org; UniProtKB - Q6P2E9). Die Funktion dieses *linker* ist bisher unbekannt, aber es ist denkbar, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen Dephosphorylierungen innerhalb der *linker* Domäne an der Ausbildung eines inaktiven oder aktiven *decapping*-Komplexes beteiligt sind. Obwohl die Mutation von EDC4 an Serin 741, sowie die Deletion der Aminosäuren 719 - 741 die virale Translation im Zellkultursystem nicht beeinflusste, ist es denkbar, dass dies in einem lebenden Organismus der Fall wäre (Abbildung 42, Abbildung 43 und Abbildung 44), da in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden konnte, dass eine kurze Deletion in der *linker*-Domäne von EDC4 eine Resistenz gegen das Rhabdovirus induziert (Cao, Magwire et al. 2016). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Depletion von EDC4 zumindest bei einem niedrigen MOI die virale Translation leicht negativ beeinflusst (Abbildung 44). Um die Funktion der EDC4 Phosphorylierung weiter zu charakterisieren, könnten die zur Verfügung stehenden Mutanten exprimiert werden, um anschließend *decapping assays* durchzuführen. Dies würde zeigen, ob die Mutationen die Ausbildung eines aktiven *decapping*-Komplexes beeinflussen, was ein Indiz dafür wäre, dass Coronaviren die mRNA Stabilitäten in infizierten Zellen durch die Modulation des mRNA

Abbaus beeinflussen. Dies steht nicht in Konkurrenz zu dem Befund, dass jede dieser Mutanten in *P-bodies* lokalisiert, da unter anderem unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe Kracht zeigen, dass die *decapping*-Reaktion primär im Zytoplasma und nicht in *P-bodies* abläuft (Dissertation Ulas Tenekeci, AG Kracht)(Decker, Teixeira et al. 2007). In einem Organismus könnten derartige Veränderungen die Aktivierung des Immunsystems behindern, sodass das Coronavirus mehr Zeit gewinnt, um seinen Replikationszyklus abzuschließen.

Darüber hinaus könnte es durchaus sein, dass der *decapping*-Komplex direkt virale RNA degradieren kann, da diese ein 5'-cap besitzt. Dementsprechend wäre es denkbar, dass eine Veränderung der *decapping*-Aktivität einen potentiellen antiviralen Mechanismus blockiert. Um dies zu testen, könnten die Mutanten erneut exprimiert werden, um die Infektion mit einer geringeren MOI durchzuführen. Dadurch ist es wahrscheinlicher positive Veränderungen der Virusreplikation zu detektieren. Ein derartiger Versuch wurde in Zellen durchgeführt, in denen EDC4 depletiert wurde und es kam zu keinen nennenswerten Veränderungen der viralen Translation, was ein solches Szenario unwahrscheinlich macht (Abbildung 44). Der gleiche Versuch offenbarte allerdings auch, dass der *decapping*-Regulator DCP1a in HeLa Zellen eine provirale Funktion hat, da dessen CRISPR-Cas9 abhängige Depletion die virale Translation hemmte. Dieser Befund konnte außerdem für die virale Transkription und Translation durch einen shRNA basierten DCP1a *knockdown* bestätigt werden (Abbildung 45). Interessanterweise kehrt sich der Effekt auf die gesamte Replikation um, wenn man den shRNA basierten DCP1a *knockdown* in A549 Zellen induziert, da in diesem Zellsystem die Replikation verstärkt wird. Detailliertere Analysen offenbarten, dass dieser Effekt daher rührt, dass in A549 Zellen initial mehr Zellen infiziert werden (Daten nicht gezeigt). In A549 Zellen konnte darüber hinaus via RNA-seq gezeigt werden, dass der DCP1a *knockdown* zu einer schwachen Repression verschiedener Gene führt, die ISGs kodieren, was erklären könnte warum sich die DCP1a depletierten A549 Zellen besser infizieren lassen. Derartige Untersuchungen in DCP1a depletierten HeLa Zellen wurden bereits angestoßen, aber eine endgültige Aussage zu den Ergebnissen kann bisher nicht getroffen werden. Es ist allerdings durchaus denkbar, dass sich der DCP1a Einfluss auf die mRNA Stabilitäten in HeLa Zellen anders als in A549 Zellen verhält, sodass es zu den beobachteten gegenteiligen Effekten auf die virale Replikation kommt. Da es sich bei A549 Zellen um epitheliale Karzinomzellen der Lunge handelt, ist es aber wahrscheinlicher, dass der A549 Befund eher die physiologische Situation widerspiegelt. Dies wird dadurch unterstützt, dass in A549 Zellen für das Poliovirus gezeigt werden konnte, dass eine DCP1a Überexpression die virale Replikation verhindert (Dougherty, Reineke et al. 2014). Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Kracht zeigen außerdem, dass die HeLa Zellen, in denen DCP1a CRISPR-Cas9 vermittelt depletiert wurden, vor allem auf der Ebene der JNK Phosphorylierung schlechter auf IL-1a reagieren (Dissertation Ulas Tenekeci, AG Kracht). Wenn dies auch für die HCoV-229E induzierte JNK Phosphorylierung der Fall ist, könnte dies den negativen Effekt auf die Virusreplikation erklären, da die inhibitorbasierte Hemmung von JNK ebenfalls die Replikation negativ beeinflusst. Dieser These folgend fungiert DCP1a als

vielfältiger Regulator in mehreren pro- und antiviralen Prozessen, sodass die Summe dieser Effekte zelltypspezifisch positiv oder negativ ausfallen kann.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit HCoV-229E induzierte Prozesse in einem bisher nicht erreichten Detail aufgeklärt werden. *Microarray* basierte Analysen offenbarten, dass es im Verlauf der HCoV-229E Infektion zu einer Aktivierung des ER Stress Signalweges kommt, wobei vor allem die PERK abhängigen Prozesse weiter charakterisiert wurden, was offenbarte, dass diese Aktivierung relevant für eine optimale Replikation der Viren ist. Darüber hinaus aktiviert das HCoV-229E proinflammatorische Prozesse ähnlich einer IL-1 α Stimulation, wobei die Überlappung beider Stimuli partieller Natur ist. In einem lasermikrodissektionsbasierten Ansatz konnte außerdem gezeigt werden, dass die Induktion der Genexpression auf infizierte Zellen beschränkt ist, sodass das Virus in der Lage zu sein scheint, parakrine und autokrine Prozesse zu blockieren. Darüber hinaus konnte durch weitere *microarrays* gezeigt werden, dass es neben der Aktivierung des proinflammatorischen und des ER Stress Signalweges zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sowie zur Reprimierung der mitochondrialen Atmungskette kommt. Die detailliertere Analyse virusinduzierter proinflammatorischer Prozesse offenbarte, dass es durch HCoV-229E und IL-1 α zu vergleichbaren MAP Kinase Aktivierungen kommt, wohingegen der NF- κ B Signalweg auf eine untypische Weise beeinflusst wird. Darauf aufbauend konnte nachgewiesen werden, dass das HCoV-229E zwar eine grundlegende Aktivierung des NF- κ B Signalweges für eine optimale Replikation benötigt, eine zu starke Aktivierung aber die Replikation hemmt. Daher sprechen die hier dargestellten Ergebnisse dafür, dass das HCoV-229E Mechanismen entwickelt hat, mit denen es den proinflammatorischen Signalweg genauestens reguliert.

Um einen tieferen Einblick in diese Prozesse zu gewähren, wurden außerdem markierungsfreie massenspektrometrische Untersuchungen von HCoV-229E induzierten posttranslationalen Modifikationen durchgeführt. Diese Analyse offenbarte, dass alle viralen Strukturproteine und mehrere weitere NSPs posttranslational acetyliert, phosphoryliert und ubiquitiniert werden, wobei ersteres und letztere ein Novum in der Coronavirusforschung darstellen. Darüber hinaus konnte für den C-terminus des N Protein nachgewiesen werden, dass dieser PERK abhängig phosphoryliert wird. Außerdem induziert die Infektion die Deregulation von hunderten Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen an Wirtsproteinen. Eine bioinformatische Analyse offenbarte ebenso viele deregulierte zelluläre Prozesse, wobei eine der am stärksten regulierten subzellulären Strukturen die Kernpore ist. Darüber hinaus offenbarten die Analysen eine Vielzahl an verändert posttranslationalen Modifikationen an *P-body* Komponenten, was mit einer Auflösung von *P-bodies* im Verlauf der Infektion einhergeht. Eine detailliertere Analyse der *P-Body* Komponente EDC4 zeigte, dass diese HCoV-229E abhängig an einer *linker* Domäne dephosphoryliert wird. Obwohl die Phosphorylierung in den bisherigen Versuchen keine Relevanz für die *P-body* Lokalisation von EDC4 oder die virale Replikation hatte, müssen weitere Versuche die Funktion dieser Dephosphorylierung aufklären. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die

P-body Komponente DCP1a die virale Replikation beeinflusst, wobei in den zwei Zelllinien HeLa und A549 gegensätzliche Ergebnisse generiert wurden. Die genaue Funktion von DCP1a im Rahmen einer Coronavirusinfektion muss daher in Folgeversuchen weiter aufgeklärt werden.

Die in dieser Arbeit generierten Daten können als Grundlage für eine Vielzahl von Folgestudien verwendet werden, sodass in Zukunft genauere Einblicke in HCoV-229E regulierte Prozesse gewährt werden. Darüber hinaus sollten im nächsten Schritt vergleichend Studien mit weiteren Coronaviren durchgeführt werden, um festzustellen, welche Mechanismen HCoV-229E und welche für alle Coronaviren spezifisch sind. Auf diese Weise können potentielle therapeutische Ansätze etabliert werden, die es ermöglichen Coronavirus infizierte Individuen mit spezifischen Medikamenten zu behandeln. Die Ergebnisse zu HCoV-229E spezifisch deregulierten Prozessen werden in Abbildung 56 grafisch zusammengefasst.

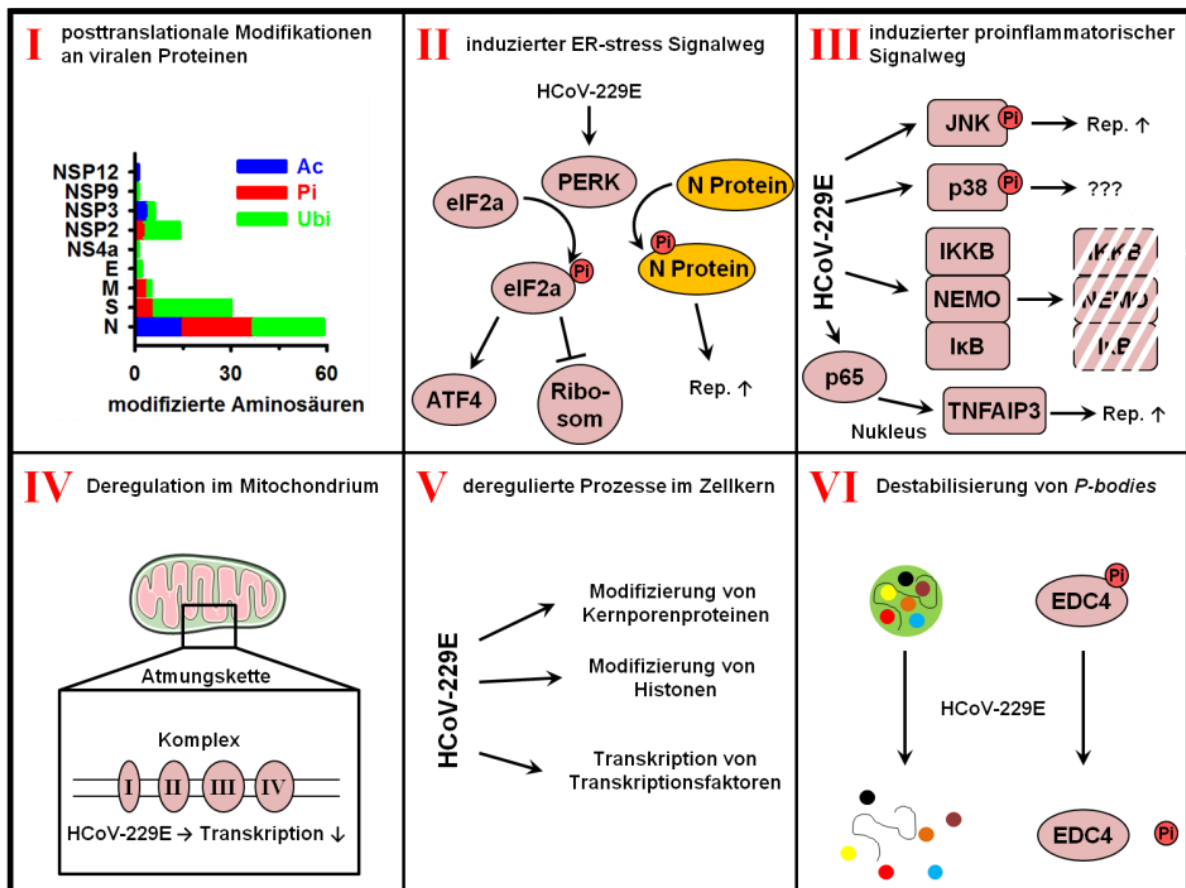
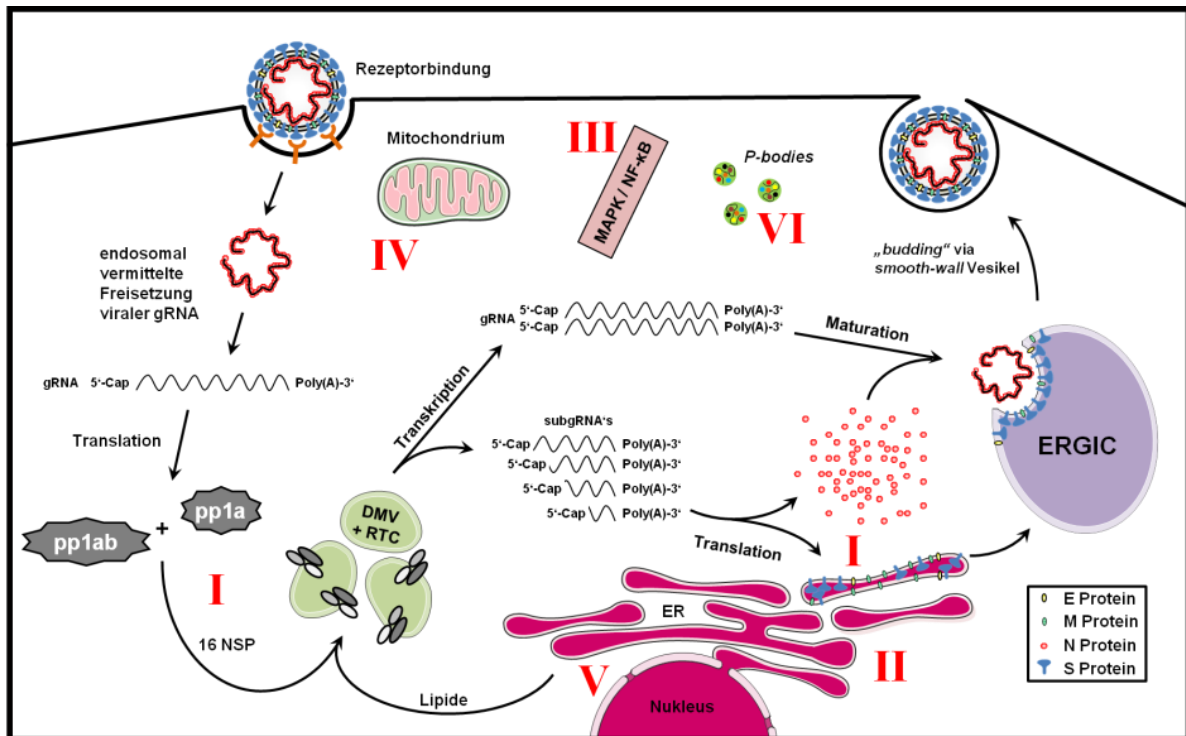


Abbildung 56: Grafische Zusammenfassung der durch eine HCoV-229E Infektion veränderten Wirtsprozesse. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels globaler Analysen verschiedene Prozesse identifiziert werden, die HCoV-229E spezifisch verändert werden. Es konnte gezeigt werden, dass virale Proteine posttranslationale Modifikationen tragen, die wahrscheinlich von zellulären Acetyltransferasen, Ubiquitinligasen und Kinasen übertragen werden (I). Außerdem kommt es

im Rahmen der Infektion zu einer Aktivierung der PERK Achse des ER Stress Signalweges, wobei dies für die C-terminale Phosphorylierung des N Proteins eine Rolle spielt (II). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine atypische Aktivierung des NF- κ B Signalweges, die eine Degradierung von IKKB und NEMO beinhaltet, die für eine optimale virale Replikation relevant ist. Gleiches gilt für die Phosphorylierung von JNK (III). Darüber hinaus kommt es im Rahmen der Infektion zur Reprimierung von Genen, die für die mitochondriale Atmungskette relevant sind (IV). Demgegenüber konnte die Induktion von Genen beobachtet werden, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, was einhergeht mit veränderten posttranslationalen Modifikationen an Histonen und an der Kernpore (V). Außerdem kommt es im Verlauf der Infektion zur Auflösung von zytoplasmatisch sichtbaren *P-bodies*, was mit einer Dephosphorylierung von EDC4 einhergeht (VI). A = Adenin, Ac = Acetylierung, DMV = *double membrane vesicle*, E = *envelope*, ER = Endoplasmatisches Retikulum, ERGIC = *endoplasmatic reticulum to Golgi intermediate compartment*, gRNA = genomische RNA, M = *membrane*, N = *nucleocapsid*, NSP = *non structural protein*, Pi = Phosphorylierung, pp = Polypotein, Rep. = Replikation, RTC = *replicase transcription complex*, S = *spike*, subgRNA = subgenomische RNA, Ubi = Ubiquitinierung

6.3 Die Charakterisierung der IL-1 α abhängigen TRAF6 vermittelten Ubiquitinierung von DCP1a

Obwohl der DCP1a *knockdown* Effekt auf die HCoV-229E Replikation in A549 und HeLa Zellen gegensätzliche Ergebnisse hatte, konnte doch in beiden Zelllinien gezeigt werden, dass durch den *knockdown* die basale mRNA Expression des Chemokingenes *IL8* auf unterschiedlichen Leveln induziert wird. Diesem Effekt liegt eine Stabilisierung der *IL8* mRNA zugrunde (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Kracht). Daher wurde das Ergebnis in HEK293 IL-1R Zellen rekapituliert, wobei die *IL8* Expression im Rahmen einer Kinetik gemessen wurde (Abbildung 47). Dadurch konnte gezeigt werden, dass nicht nur die basale *IL8* Expression induziert wird, sondern auch die stimulierbare. Darüber hinaus nehmen ohne DCP1a die *IL8* mRNA Mengen acht Stunden nach der IL-1 α Stimulation nicht wieder ab, sondern verbleiben auf dem erhöhten Niveau. Dieses Ergebnis ist ein starkes Indiz dafür, dass die *IL8* mRNA DCP1a und damit *decapping* vermittelt abgebaut wird und impliziert, dass dies vielleicht für weitere oder sogar alle IL-1 α induzierten Gene der Fall ist. Daher kann angenommen werden, dass der *decapping*-Komplex eine essentielle Struktur im proinflammatorischen Signalweg darstellt. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kracht zeigen, dass DCP1a im Rahmen einer IL-1 α Stimulation an Serin 315 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung ist für die IL-1 α stimulierte Expressionsinduktion von *IL8* essentiell, da die Überexpression einer phosphorylierungsinkompetenten -, oder einer phosphomimetischen Mutante die Expressionsinduktion des *IL8* Genes vollständig hemmt (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Darüber hinaus konnte in dieser Publikation nachgewiesen werden, dass die DCP1a Phosphorylierung von JNK vermittelt wird und dass die Phosphorylierung von DCP1a in Zusammenhang mit dessen Rekrutierung in *P-bodies* steht. Die hier präsentierten Daten zeigen, dass die DCP1a Phosphorylierung auch durch TRAF6 induziert werden kann, wobei dieser Effekt indirekter Natur ist, da er durch den JNK Inhibitor

SP600125 blockiert werden kann, was die Relevanz der MAP Kinase JNK für diesen Prozess herausstellt. Mit aufsteigenden TRAF6 Mengen konnte auch eine verstärkte JNK abhängige JUN Phosphorylierung beobachtet werden. Überraschenderweise wird die Phosphorylierung von DCP1a durch erhöhte TRAF6 Mengen negativ beeinflusst (Abbildung 49). Diese Beobachtung ist vereinbar mit einem Modell für die DCP1a-JNK Interaktion, in welchem TRAF6 für die Interaktion der beiden Proteine relevant ist. Durch eine zu hohe Anzahl an TRAF6 Molekülen in der Zelle wird die Stöchiometrie der drei Partner DCP1a, JNK und TRAF6 gestört, sodass es zu einer geringeren Phosphorylierung von DCP1a kommt. Da die JUN Phosphorylierung davon nicht betroffen ist, verläuft die Interaktion zwischen JUN und JNK unabhängig von TRAF6. Um diese Hypothese zu testen, wurden Ko-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt, wobei verschiedene DCP1a Mutanten verwendet wurden. Dadurch konnte die direkte Interaktion von DCP1a und TRAF6 bestätigt werden, wobei dafür weder die Transaktivierungsdomäne, noch die Trimerisierungskompetenz oder eine potentielle Ubiquitinierung am C-Terminus von DCP1a relevant sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Verwendung einer inaktiven TRAF6 Mutante die Phosphorylierungsinduktion an DCP1a massiv hemmt (Abbildung 52). Da die Ubiquitinligasefunktion von TRAF6 eine Rolle für die Phosphorylierung von DCP1a zu spielen scheint, erweitert dies das Modell für die DCP1a-JNK-TRAF6 Interaktion um eine weitere Komponente. Es ist daher wahrscheinlich, dass TRAF6 zunächst DCP1a bindet und Ubiquitinketten auf dieses überträgt. Daraufhin kann JNK diesen Komplex binden und phosphoryliert DCP1a an Serin 315, was dessen Translokation in *P-bodies* bewirkt. Um diese These zu prüfen, wurden daher Ni²⁺-NTA *pulldowns* mit HIS-markiertem Ubiquitin und einer gleichzeitigen Überexpression von TRAF6 durchgeführt. Dies bestätigte, dass DCP1a Ubiquitinketten tragen kann und dass diese Ubiquitinierung durch TRAF6 verstärkt wird. Außerdem konnte dieses Ergebnis im Rahmen einer Ubiquitin IP bestätigt werden (Abbildung 50). Da bekannt ist, dass die Trimerisierung von DCP1a essentiell für die Ausbildung eines funktionellen *decapping*-Komplexes und die Lokalisierung in *P-bodies* ist, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Trimerisierung auch die Ubiquitinierung und die Phosphorylierung von DCP1a beeinflusst (Tritschler, Braun et al. 2009). Es zeigte sich, dass zwar die Existenz des C-Terminus von DCP1a, aber nicht die Trimerisierungskompetenz, oder die sechs C-Terminalen Lysine für die Ubiquitinierung relevant sind. Darüber hinaus offenbarte die Analyse, dass die Erhöhung der intrazellulären Ubiquitinabundanz ausreicht, um eine verstärkte Phosphorylierung von DCP1a zu induzieren. Dieser Effekt ist allerdings von der Trimerisierungskompetenz abhängig und gilt daher nur für DCP1a welches in *P-bodies* lokalisiert (Abbildung 54 und Abbildung 55). Dies erweitert das bisherige Modell der DCP1a Funktion um einen weiteren Schritt, im Zuge dessen offensichtlich die Trimerisierung für die Rekrutierung der Kinase JNK eine Rolle spielt. Obwohl Ko-Immunpräzipitationsexperimente zeigten, dass TRAF6 auch mit der DCP1a Mutante interagiert, bei der die C-Terminale Domäne deletiert wurde, kann diese Mutante nicht mehr ubiquitiniert werden. Dies impliziert, dass diese Domäne nicht für die TRAF6 Rekrutierung, aber möglicherweise für die Rekrutierung weiterer Faktoren von Nöten

ist, die die Übertragung von Ubiquitinresten steuern. Darüber hinaus ist es allerdings auch denkbar, dass es durch die gleichzeitige Überexpression von DCP1a und TRAF6 zu einer unphysiologischen Interaktion beider Partner kommt, die nicht die physiologische Situation widerspiegelt. Um dies auszuschließen, könnte man die Interaktion von überexprimierten DCP1a Mutanten mit endogenem TRAF6 untersuchen. Dies könnte offenbaren, dass TRAF6 doch direkt mit dem C-Terminus interagiert. Unabhängig davon scheint der C-Terminus von DCP1a essentiell für eine erfolgreiche DCP1a Ubiquitinierung zu sein, die wiederum die Grundlage für eine Rekrutierung von JNK an trimerisiertes DCP1a darstellt. Da die Ubiquitinierung auch an Trimerisierungsinkompetenten DCP1a Mutanten nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass diese TRAF6 abhängig im Zytoplasma stattfindet. Offen bleibt die Frage, ob die JNK abhängige Phosphorylierung ebenfalls im Zytoplasma stattfindet, oder ob der TRAF6-DCP1a Komplex und JNK zunächst in *P-bodies* rekrutiert werden und die Phosphorylierung dort induziert wird. Um dies zu testen, könnte man DCP1a in Zellen exprimieren, die keine *P-bodies* mehr haben. Wenn DCP1a in dieser Zelllinie schwächer phosphoryliert wird, ist dies ein starkes Indiz dafür, dass JNK an oder in *P-bodies* an ubiquitiniertes DCP1a rekrutiert wird und es erst danach zu einer Phosphorylierung kommt. Tatsächlich haben die Zellen der in Abbildung 44 verwendeten EDC4 depletierten HeLa Zelllinie keine *P-bodies* mehr, was mit einer verringerten Menge von phosphoryliertem DCP1a einhergeht (Dissertation Ulas Tenekeci, AG Kracht). Nichtsdestotrotz muss auch erwähnt werden, dass dieser Mechanismus nur für den proinflammatorischen Signalweg repräsentativ ist. Unter anderen Stressbedingungen, wie der Blockierung der zellulären Translation durch Anisomycin kommt es zur Auflösung der *P-bodies* und zu einer sehr starken Phosphorylierung von DCP1a (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Da die Überexpression einer phosphomimetischen S315D DCP1a Mutante ebenfalls *P-bodies* auflöst, scheint der Zusammenhang zwischen DCP1a Phosphorylierung und der *P-body* Bildung deutlich komplexer zu sein, als es in dieser Arbeit hätte aufgeklärt werden können (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Eine Erklärung könnte sein, dass die Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 auch durch weitere Kinasen reguliert werden kann. Im Rahmen einer *respiratory syncytial virus* Infektion konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es zu einer ERK abhängigen Phosphorylierung von DCP1a kommt. Darüber hinaus kommt es trotz der starken Phosphorylierung zu einer Abnahme, aber nicht zu einer vollständigen Auflösung der *P-bodies* (Dickey, Duncan et al. 2015).

Nichtsdestotrotz konnte durch die hier dargestellten Experimente ein Mechanismus für die IL-1a abhängige Integration von Signalen zum *decapping*-Komplex aufgeklärt werden, bei dem DCP1a als mono- oder trimerem konstitutiv TRAF6 abhängig ubiquitiniert wird. Nach einer IL-1a abhängigen Stimulation der JNK Phosphorylierung wird dieses an oder in *P-bodies* rekrutiert, wo es die Phosphorylierung von trimerem ubiquitiniertem DCP1a induziert. Dies wiederum hat Einfluss auf den mRNA Abbau und die Proteinzusammensetzung in *P-bodies* (grafisch zusammengefasst in Abbildung 57).

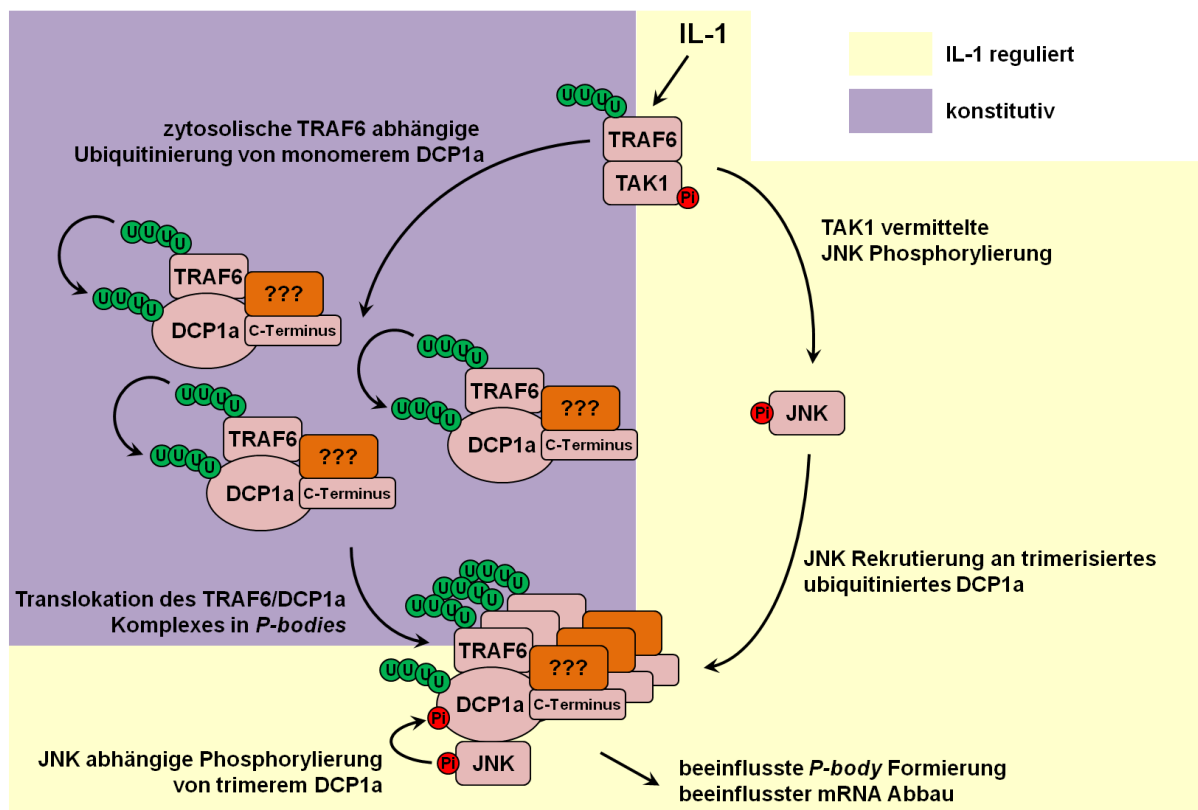


Abbildung 57: Grafische Zusammenfassung der TRAF6 abhängigen Ubiquitinierung von DCP1a und dessen Relevanz für eine IL-1 abhängige DCP1a Phosphorylierung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass DCP1a konstitutiv TRAF6 abhängig ubiquitiniert wird, wobei dies unabhängig von der Trimerisierungskompetenz von DCP1a stattfindet. Die Rekrutierung von JNK hingegen ist höchstwahrscheinlich von der Trimerisierungskompetenz abhängig, sodass die DCP1a Phosphorylierung an oder in *P-bodies* stattfindet. Dies impliziert, dass *P-bodies* eine wichtige Struktur für die Integration und Verarbeitung von proinflammatorischen Signalen darstellen. Für die HCov-229E Infektion ist dieser Mechanismus vermutlich nicht relevant, da hierbei *P-bodies* aufgelöst werden. Die beteiligten Komponenten (DCP1a, JNK und Ubiquitinligasen) spielen allerdings, wie in der Arbeit gezeigt, eine zentrale Rolle im Rahmen der Wirtsantwort.

7 Anhang:

7.1 Literaturverzeichnis

- Adler, V., M. R. Pincus, et al. (1997). "Conformation-dependent phosphorylation of p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1686-1691.
- Aich, P., H. L. Wilson, et al. (2007). "Comparative analysis of innate immune responses following infection of newborn calves with bovine rotavirus and bovine coronavirus." *J Gen Virol* **88**(Pt 10): 2749-2761.
- Aizer, A., P. Kafri, et al. (2013). "The P body protein Dcp1a is hyper-phosphorylated during mitosis." *PLoS One* **8**(1): e49783.
- Anderson, P. (2008). "Post-transcriptional control of cytokine production." *Nat Immunol* **9**(4): 353-359.
- Andrei, M. A., D. Ingelfinger, et al. (2005). "A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies." *RNA* **11**(5): 717-727.
- Angelini, M. M., M. Akhlaghpour, et al. (2013). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles." *MBio* **4**(4).
- Ardito, F., M. Giuliani, et al. (2017). "The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)." *Int J Mol Med* **40**(2): 271-280.
- Ariumi, Y., M. Kuroki, et al. (2007). "DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **81**(24): 13922-13926.
- Ariumi, Y., M. Kuroki, et al. (2011). "Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets." *J Virol* **85**(14): 6882-6892.
- Axten, J. M., J. R. Medina, et al. (2012). "Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)." *J Med Chem* **55**(16): 7193-7207.
- Bai, R. Y., C. Koester, et al. (2002). "SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling." *Nat Cell Biol* **4**(3): 181-190.
- Banerjee, S., K. Narayanan, et al. (2002). "Murine coronavirus replication-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation promotes interleukin-6 production and virus replication in cultured cells." *J Virol* **76**(12): 5937-5948.
- Bannon, A., S. D. Zhang, et al. (2015). "Cystic Fibrosis from Laboratory to Bedside: The Role of A20 in NF-kappaB-Mediated Inflammation." *Med Princ Pract* **24**(4): 301-310.
- Barbee, S. A., P. S. Estes, et al. (2006). "Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies." *Neuron* **52**(6): 997-1009.
- Bechill, J., Z. Chen, et al. (2008). "Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression." *J Virol* **82**(9): 4492-4501.
- Bekes, M., G. J. van der Heden van Noort, et al. (2016). "Recognition of Lys48-Linked Di-ubiquitin and Deubiquitinating Activities of the SARS Coronavirus Papain-like Protease." *Mol Cell* **62**(4): 572-585.
- Ben-Neriah, Y. (2002). "Regulatory functions of ubiquitination in the immune system." *Nat Immunol* **3**(1): 20-26.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol* **2**(6): 326-332.
- Bhowmick, R., A. Mukherjee, et al. (2015). "Rotavirus disrupts cytoplasmic P bodies during infection." *Virus Res* **210**: 344-354.

- Bouman, L., A. Schlierf, et al. (2011). "Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress." *Cell Death Differ* **18**(5): 769-782.
- Braun, J. E., V. Truffault, et al. (2012). "A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation." *Nat Struct Mol Biol* **19**(12): 1324-1331.
- Brierley, I., M. E. Bournsnel, et al. (1987). "An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV." *EMBO J* **6**(12): 3779-3785.
- Calfon, M., H. Zeng, et al. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." *Nature* **415**(6867): 92-96.
- Calvo, E., D. Escors, et al. (2005). "Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells." *J Gen Virol* **86**(Pt 8): 2255-2267.
- Cao, C., M. M. Magwire, et al. (2016). "A Polymorphism in the Processing Body Component Ge-1 Controls Resistance to a Naturally Occurring Rhabdovirus in Drosophila." *PLoS Pathog* **12**(1): e1005387.
- Chahar, H. S., S. Chen, et al. (2013). "P-body components LSM1, GW182, DDX3, DDX6 and XRN1 are recruited to WNV replication sites and positively regulate viral replication." *Virology* **436**(1): 1-7.
- Chan, C. P., K. L. Siu, et al. (2006). "Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein." *J Virol* **80**(18): 9279-9287.
- Chan, J. F., K. K. To, et al. (2013). "Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds." *Trends Microbiol* **21**(10): 544-555.
- Chang, C. T., N. Bercovich, et al. (2014). "The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1." *Nucleic Acids Res* **42**(8): 5217-5233.
- Chatterjee, D., S. Addya, et al. (2014). "Mouse hepatitis virus infection upregulates genes involved in innate immune responses." *PLoS One* **9**(10): e111351.
- Cheadle, C., J. Fan, et al. (2005). "Stability regulation of mRNA and the control of gene expression." *Ann N Y Acad Sci* **1058**: 196-204.
- Chen, H., A. Gill, et al. (2005). "Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in RNA binding by using surface plasmon resonance." *J Virol* **79**(2): 1164-1179.
- Cheung, P. C., A. R. Nebreda, et al. (2004). "TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1." *Biochem J* **378**(Pt 1): 27-34.
- Chhabra, R., J. Chantrey, et al. (2015). "Immune Responses to Virulent and Vaccine Strains of Infectious Bronchitis Viruses in Chickens." *Viral Immunol* **28**(9): 478-488.
- Chlebowski, A., M. Lubas, et al. (2013). "RNA decay machines: the exosome." *Biochim Biophys Acta* **1829**(6-7): 552-560.
- Coleman, C. M., J. M. Sisk, et al. (2017). "CD8+ T Cells and Macrophages Regulate Pathogenesis in a Mouse Model of Middle East Respiratory Syndrome." *J Virol* **91**(1).
- Cong, F., X. Liu, et al. (2013). "Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection." *BMC Genomics* **14**: 743.
- Cornillez-Ty, C. T., L. Liao, et al. (2009). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling." *J Virol* **83**(19): 10314-10318.
- Cougot, N., S. Babajko, et al. (2004). "Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells." *J Cell Biol* **165**(1): 31-40.
- Cruz, J. L., I. Sola, et al. (2011). "Coronavirus gene 7 counteracts host defenses and modulates virus virulence." *PLoS Pathog* **7**(6): e1002090.
- Dar, A., S. Munir, et al. (2005). "Transcriptional analysis of avian embryonic tissues following infection with avian infectious bronchitis virus." *Virus Res* **110**(1-2): 41-55.

- Decker, C. J., D. Teixeira, et al. (2007). "Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **179**(3): 437-449.
- DeDiego, M. L., J. L. Nieto-Torres, et al. (2011). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002315.
- DeDiego, M. L., J. L. Nieto-Torres, et al. (2014). "Inhibition of NF-kappaB-mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival." *J Virol* **88**(2): 913-924.
- Dejeans, N., S. Manie, et al. (2014). "Addicted to secrete - novel concepts and targets in cancer therapy." *Trends Mol Med* **20**(5): 242-250.
- Desforges, M., J. Desjardins, et al. (2013). "The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus." *J Virol* **87**(6): 3097-3107.
- Diamant, G. and R. Dikstein (2013). "Transcriptional control by NF-kappaB: elongation in focus." *Biochim Biophys Acta* **1829**(9): 937-945.
- Dickey, L. L., J. K. Duncan, et al. (2015). "Decapping protein 1 phosphorylation modulates IL-8 expression during respiratory syncytial virus infection." *Virology* **481**: 199-209.
- Dinareello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annu Rev Immunol* **27**: 519-550.
- Ding, Z., K. An, et al. (2017). "Transmissible gastroenteritis virus infection induces NF-kappaB activation through RLR-mediated signaling." *Virology* **507**: 170-178.
- Dougherty, J. D., L. C. Reineke, et al. (2014). "mRNA decapping enzyme 1a (Dcp1a)-induced translational arrest through protein kinase R (PKR) activation requires the N-terminal enabled vasodilator-stimulated protein homology 1 (EVH1) domain." *J Biol Chem* **289**(7): 3936-3949.
- Dougherty, J. D., J. P. White, et al. (2011). "Poliovirus-mediated disruption of cytoplasmic processing bodies." *J Virol* **85**(1): 64-75.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing." *Mol Cell Biol* **27**(11): 3970-3981.
- Eystathiou, T., E. K. Chan, et al. (2002). "A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles." *Mol Biol Cell* **13**(4): 1338-1351.
- Fagone, P. and S. Jackowski (2009). "Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function." *J Lipid Res* **50 Suppl**: S311-S316.
- Fend, F., M. R. Emmert-Buck, et al. (1999). "Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis." *Am J Pathol* **154**(1): 61-66.
- Ferraiuolo, M. A., S. Basak, et al. (2005). "A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay." *J Cell Biol* **170**(6): 913-924.
- Franks, T. M. and J. Lykke-Andersen (2008). "The control of mRNA decapping and P-body formation." *Mol Cell* **32**(5): 605-615.
- Frieman, M., B. Yount, et al. (2007). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane." *J Virol* **81**(18): 9812-9824.
- Fukushi, M., Y. Yoshinaka, et al. (2012). "Monitoring of S protein maturation in the endoplasmic reticulum by calnexin is important for the infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus." *J Virol* **86**(21): 11745-11753.
- Fung, T. S., Y. Liao, et al. (2014). "The endoplasmic reticulum stress sensor IRE1alpha protects cells from apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus." *J Virol* **88**(21): 12752-12764.
- Fung, T. S. and D. X. Liu (2014). "Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity." *Front Microbiol* **5**: 296.

- Gaestel, M., A. Kotlyarov, et al. (2009). "Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation." *Nat Rev Drug Discov* **8**(6): 480-499.
- Garcia-Sastre, A. (2017). "Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses." *Cell Host Microbe* **22**(2): 176-184.
- Garcia, M. A., E. F. Meurs, et al. (2007). "The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control." *Biochimie* **89**(6-7): 799-811.
- Garlanda, C., C. A. Dinarello, et al. (2013). "The interleukin-1 family: back to the future." *Immunity* **39**(6): 1003-1018.
- Giansanti, P., L. Tsiatsiani, et al. (2016). "Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin." *Nat Protoc* **11**(5): 993-1006.
- Goldstrohm, A. C. and M. Wickens (2008). "Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4): 337-344.
- Gong, J., X. Z. Wang, et al. (2017). "Molecular signal networks and regulating mechanisms of the unfolded protein response." *J Zhejiang Univ Sci B* **18**(1): 1-14.
- Gorbalenya, A. E., L. Enjuanes, et al. (2006). "Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome." *Virus Res* **117**(1): 17-37.
- Gosert, R., A. Kanjanahaluethai, et al. (2002). "RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles." *J Virol* **76**(8): 3697-3708.
- Graham, R. L., E. F. Donaldson, et al. (2013). "A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses." *Nat Rev Microbiol* **11**(12): 836-848.
- Graham, R. L., A. C. Sims, et al. (2005). "The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication." *J Virol* **79**(21): 13399-13411.
- Hall, C., M. Wu, et al. (1966). "Piericidin A: a new inhibitor of mitochondrial electron transport." *Biochem Biophys Res Commun* **25**(4): 373-377.
- Harding, H. P., H. Zeng, et al. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." *Mol Cell* **7**(6): 1153-1163.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." *Nature* **397**(6716): 271-274.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." *Mol Cell* **11**(3): 619-633.
- Haze, K., H. Yoshida, et al. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." *Mol Biol Cell* **10**(11): 3787-3799.
- Hetz, C., E. Chevet, et al. (2015). "Proteostasis control by the unfolded protein response." *Nat Cell Biol* **17**(7): 829-838.
- Hofmann, H., K. Pyrc, et al. (2005). "Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(22): 7988-7993.
- Huang, X., W. Dong, et al. (2015). "Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses O-Acetylated Sialic Acid as an Attachment Receptor Determinant and Employs Hemagglutinin-Esterase Protein as a Receptor-Destroying Enzyme." *J Virol* **89**(14): 7202-7213.
- Ikon, N. and R. O. Ryan (2017). "Cardiolipin and mitochondrial cristae organization." *Biochim Biophys Acta* **1859**(6): 1156-1163.
- Jenkins, G. M., A. Rambaut, et al. (2002). "Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis." *J Mol Evol* **54**(2): 156-165.
- Jiang, Y., J. Xu, et al. (2005). "Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(8): 850-857.
- Jones, C. I., M. V. Zabolotskaya, et al. (2012). "The 5' --> 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**(4): 455-468.

- Jurida, L., J. Soelch, et al. (2015). "The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF-kappaB p65." Cell Rep.
- Ke, S., A. Pandya-Jones, et al. (2017). "m6A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover." Genes Dev **31**(10): 990-1006.
- Khong, A. and E. Jan (2011). "Modulation of stress granules and P bodies during dicistrovirus infection." J Virol **85**(4): 1439-1451.
- Kindler, E., V. Thiel, et al. (2016). "Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response." Adv Virus Res **96**: 219-243.
- Koplan, J. P., D. Butler-Jones, et al. (2013). "Public health lessons from severe acute respiratory syndrome a decade later." Emerg Infect Dis **19**(6): 861-863.
- Krijnse-Locker, J., M. Ericsson, et al. (1994). "Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step." J Cell Biol **124**(1-2): 55-70.
- Kuhn, J. H., W. Li, et al. (2004). "Angiotensin-converting enzyme 2: a functional receptor for SARS coronavirus." Cell Mol Life Sci **61**(21): 2738-2743.
- Kulkarni, M., S. Ozgur, et al. (2010). "On track with P-bodies." Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 242-251.
- Kuo, L., G. J. Godeke, et al. (2000). "Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier." J Virol **74**(3): 1393-1406.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-869.
- LaBarre, D. D. and R. J. Lowy (2001). "Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays." J Virol Methods **96**(2): 107-126.
- Lai, M. M. and D. Cavanagh (1997). "The molecular biology of coronaviruses." Adv Virus Res **48**: 1-100.
- Lam, A. K. and A. Galione (2013). "The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling." Biochim Biophys Acta **1833**(11): 2542-2559.
- Lau, S. K., C. C. Lau, et al. (2013). "Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment." J Gen Virol **94**(Pt 12): 2679-2690.
- Lee, J. E., M. Oney, et al. (2015). "Drosophila melanogaster activating transcription factor 4 regulates glycolysis during endoplasmic reticulum stress." G3 (Bethesda) **5**(4): 667-675.
- Leong, W. F., H. C. Tan, et al. (2005). "Microarray and real-time RT-PCR analyses of differential human gene expression patterns induced by severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection of Vero cells." Microbes Infect **7**(2): 248-259.
- Li, J., Y. Liu, et al. (2010). "Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5." J Virol **84**(13): 6472-6482.
- Li, Y., Z. Ren, et al. (2011). "Expression, crystallization and preliminary crystallographic study of the C-terminal half of nsp2 from SARS coronavirus." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **67**(Pt 7): 790-793.
- Liao, Y., T. S. Fung, et al. (2013). "Upregulation of CHOP/GADD153 during coronavirus infectious bronchitis virus infection modulates apoptosis by restricting activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway." J Virol **87**(14): 8124-8134.
- Liao, Y., X. Wang, et al. (2011). "Regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase and dual-specificity phosphatase 1 feedback loop modulates the induction of interleukin 6 and 8 in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus." Virology **420**(2): 106-116.
- Liu, C., Y. Huang, et al. (2017). "Intracellular methylglyoxal induces oxidative damage to pancreatic beta cell line INS-1 cell through Ire1alpha-JNK and mitochondrial apoptotic pathway." Free Radic Res **51**(4): 337-350.
- Liu, F., A. J. Gore, et al. (2014). "DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine." PLoS One **9**(1): e84982.

- Liu, J., F. V. Rivas, et al. (2005). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." *Nat Cell Biol* **7**(12): 1261-1266.
- Liu, Q., Y. Zhang, et al. (2012). "A crosstalk between the Smad and JNK signaling in the TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in rat peritoneal mesothelial cells." *PLoS One* **7**(2): e32009.
- Lo, Y. S., S. Y. Lin, et al. (2013). "Oligomerization of the carboxyl terminal domain of the human coronavirus 229E nucleocapsid protein." *FEBS Lett* **587**(2): 120-127.
- Luo, H., F. Ye, et al. (2005). "SR-rich motif plays a pivotal role in recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein multimerization." *Biochemistry* **44**(46): 15351-15358.
- Lussignol, M., M. Kopp, et al. (2016). "Proteomics of HCV virions reveals an essential role for the nucleoporin Nup98 in virus morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(9): 2484-2489.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways." *J Biol Chem* **279**(14): 13792-13799.
- Marnef, A. and N. Standart (2010). "Pat1 proteins: a life in translation, translation repression and mRNA decay." *Biochem Soc Trans* **38**(6): 1602-1607.
- Masters, P. S. (2006). "The molecular biology of coronaviruses." *Adv Virus Res* **66**: 193-292.
- Matsushita, K., O. Takeuchi, et al. (2009). "Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay." *Nature* **458**(7242): 1185-1190.
- Mbalaviele, G., C. D. Sommers, et al. (2009). "A novel, highly selective, tight binding IkappaB kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor-kappaB pathway in arthritis-relevant cells and animal models." *J Pharmacol Exp Ther* **329**(1): 14-25.
- McBride, R., M. van Zyl, et al. (2014). "The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein." *Viruses* **6**(8): 2991-3018.
- Mehrbod, P., M. S. Harun, et al. (2015). "Transcriptome analysis of feline infectious peritonitis virus infection." *Methods Mol Biol* **1282**: 241-250.
- Meister, G., M. Landthaler, et al. (2005). "Identification of novel argonaute-associated proteins." *Curr Biol* **15**(23): 2149-2155.
- Milac, A. L., E. Bojarska, et al. (2014). "Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism." *Biochim Biophys Acta* **1839**(6): 452-462.
- Mizutani, T., S. Fukushi, et al. (2006). "Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells." *Biochem Biophys Res Commun* **347**(1): 261-265.
- Mizutani, T., S. Fukushi, et al. (2004). "Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells." *Biochem Biophys Res Commun* **319**(4): 1228-1234.
- Mizutani, T., S. Fukushi, et al. (2005). "JNK and PI3k/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells." *Biochim Biophys Acta* **1741**(1-2): 4-10.
- Mok, B. W., W. Song, et al. (2012). "The NS1 protein of influenza A virus interacts with cellular processing bodies and stress granules through RNA-associated protein 55 (RAP55) during virus infection." *J Virol* **86**(23): 12695-12707.
- Moon, S. L., J. R. Anderson, et al. (2012). "A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability." *RNA* **18**(11): 2029-2040.
- Mori, K. (2000). "Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum." *Cell* **101**(5): 451-454.
- Morton, S., R. J. Davis, et al. (2003). "A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun." *EMBO J* **22**(15): 3876-3886.
- Munoz, J. P., S. Ivanova, et al. (2013). "Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK." *EMBO J* **32**(17): 2348-2361.

- Nagano, H., K. Yagyu, et al. (1989). "Purification of infectious bronchitis coronavirus by Sephacryl S-1000 gel chromatography." *Vet Microbiol* **21**(2): 115-123.
- Nakagawa, K., K. G. Lokugamage, et al. (2016). "Viral and Cellular mRNA Translation in Coronavirus-Infected Cells." *Adv Virus Res* **96**: 165-192.
- Neuman, B. W., M. M. Angelini, et al. (2014). "Does form meet function in the coronavirus replicative organelle?" *Trends Microbiol* **22**(11): 642-647.
- Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, et al. (1999). "The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway." *Nature* **398**(6724): 252-256.
- Nissan, T., P. Rajyaguru, et al. (2010). "Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms." *Mol Cell* **39**(5): 773-783.
- Ogata, M., S. Hino, et al. (2006). "Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell Biol* **26**(24): 9220-9231.
- Oostra, M., E. G. te Lintelo, et al. (2007). "Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication." *J Virol* **81**(22): 12323-12336.
- Ordureau, A., C. Munch, et al. (2015). "Quantifying ubiquitin signaling." *Mol Cell* **58**(4): 660-676.
- Pager, C. T., S. Schutz, et al. (2013). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance and virus release by dispersion of processing bodies and enrichment of stress granules." *Virology* **435**(2): 472-484.
- Panda, D., B. Gold, et al. (2015). "The transcription factor FoxK participates with Nup98 to regulate antiviral gene expression." *MBio* **6**(2).
- Parker, R. and U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." *Mol Cell* **25**(5): 635-646.
- Peiris, J. S., S. T. Lai, et al. (2003). "Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome." *Lancet* **361**(9366): 1319-1325.
- Pena-Blanco, A. and A. J. Garcia-Saez (2017). "Bax, Bak and beyond: mitochondrial performance in apoptosis." *FEBS J*.
- Peng, T. Y., K. R. Lee, et al. (2008). "Phosphorylation of the arginine/serine dipeptide-rich motif of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein modulates its multimerization, translation inhibitory activity and cellular localization." *FEBS J* **275**(16): 4152-4163.
- Perez-Vilaro, G., N. Scheller, et al. (2012). "Hepatitis C virus infection alters P-body composition but is independent of P-body granules." *J Virol* **86**(16): 8740-8749.
- Perlman, S. and J. Netland (2009). "Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis." *Nat Rev Microbiol* **7**(6): 439-450.
- Pijlman, G. P., A. Funk, et al. (2008). "A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity." *Cell Host Microbe* **4**(6): 579-591.
- Pillai, R. S. (2005). "MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?" *RNA* **11**(12): 1753-1761.
- Plass, M., S. H. Rasmussen, et al. (2017). "Highly accessible AU-rich regions in 3' untranslated regions are hotspots for binding of regulatory factors." *PLoS Comput Biol* **13**(4): e1005460.
- Poppe, M., S. Wittig, et al. (2017). "The NF-kappaB-dependent and -independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells." *PLoS Pathog* **13**(3): e1006286.
- Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, et al. (1991). "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases." *Nature* **353**(6345): 670-674.
- Raaben, M., M. J. Groot Koerkamp, et al. (2007). "Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies." *Cell Microbiol* **9**(9): 2218-2229.
- Raj, V. S., H. Mou, et al. (2013). "Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC." *Nature* **495**(7440): 251-254.

- Ramakrishnan, M. A. (2016). "Determination of 50% endpoint titer using a simple formula." World J Virol **5**(2): 85-86.
- Reed, S. E. (1984). "The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E-related strains." J Med Virol **13**(2): 179-192.
- Rehwinkel, J., I. Behm-Ansmant, et al. (2005). "A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing." RNA **11**(11): 1640-1647.
- Reid, D. W. and C. V. Nicchitta (2015). "Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **16**(4): 221-231.
- Rock, K. L., C. Gramm, et al. (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." Cell **78**(5): 761-771.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.
- Rzeczkowski, K., K. Beuerlein, et al. (2011). "c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies." J Cell Biol **194**(4): 581-596.
- Scheuner, D., B. Song, et al. (2001). "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis." Mol Cell **7**(6): 1165-1176.
- Schmidt, A., I. Forne, et al. (2014). "Bioinformatic analysis of proteomics data." BMC Syst Biol **8 Suppl 2**: S3.
- Seto, E., R. Yoshida-Sugitani, et al. (2015). "The Assembly of EDC4 and Dcp1a into Processing Bodies Is Critical for the Translational Regulation of IL-6." PLoS One **10**(5): e0123223.
- Sheth, U. and R. Parker (2006). "Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies." Cell **125**(6): 1095-1109.
- Shuid, A. N., N. Safi, et al. (2015). "Apoptosis transcriptional mechanism of feline infectious peritonitis virus infected cells." Apoptosis **20**(11): 1457-1470.
- Silva, P. A., C. F. Pereira, et al. (2010). "An RNA pseudoknot is required for production of yellow fever virus subgenomic RNA by the host nuclease XRN1." J Virol **84**(21): 11395-11406.
- Simon, A., S. Volz, et al. (2007). "Acute life threatening event (ALTE) in an infant with human coronavirus HCoV-229E infection." Pediatr Pulmonol **42**(4): 393-396.
- Sims, A. C., S. C. Tilton, et al. (2013). "Release of severe acute respiratory syndrome coronavirus nuclear import block enhances host transcription in human lung cells." J Virol **87**(7): 3885-3902.
- Smits, S. L., A. de Lang, et al. (2010). "Exacerbated innate host response to SARS-CoV in aged non-human primates." PLoS Pathog **6**(2): e1000756.
- Snijder, E. J., Y. van der Meer, et al. (2006). "Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex." J Virol **80**(12): 5927-5940.
- Sola, I., F. Almazan, et al. (2015). "Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses." Annu Rev Virol **2**(1): 265-288.
- Song, D. and B. Park (2012). "Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines." Virus Genes **44**(2): 167-175.
- Stohlman, S. A., J. O. Fleming, et al. (1983). "Synthesis and subcellular localization of the murine coronavirus nucleocapsid protein." Virology **130**(2): 527-532.
- Tam, A. B., E. L. Mercado, et al. (2012). "ER stress activates NF-kappaB by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK." PLoS One **7**(10): e45078.
- Tang, B. S., K. H. Chan, et al. (2005). "Comparative host gene transcription by microarray analysis early after infection of the Huh7 cell line by severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E." J Virol **79**(10): 6180-6193.

- Tang, B. S., K. H. Chan, et al. (2009). "Comparative host gene transcription by microarray analysis early after infection of the Huh7 cell line by SARS coronavirus and human coronavirus 229E." *Hong Kong Med J* **15** *Suppl 9*: 23-26.
- Teixeira, D., U. Sheth, et al. (2005). "Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs." *RNA* **11**(4): 371-382.
- Tenekeci, U., M. Poppe, et al. (2016). "K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping." *Mol Cell* **62**(6): 943-957.
- Thierbach, G. and H. Reichenbach (1981). "Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration." *Antimicrob Agents Chemother* **19**(4): 504-507.
- Tirasophon, W., A. A. Welihinda, et al. (1998). "A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells." *Genes Dev* **12**(12): 1812-1824.
- Tournier, C., C. Dong, et al. (2001). "MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines." *Genes Dev* **15**(11): 1419-1426.
- Tritschler, F., J. E. Braun, et al. (2009). "DCP1 forms asymmetric trimers to assemble into active mRNA decapping complexes in metazoa." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21591-21596.
- Tritschler, F., A. Eulalio, et al. (2007). "A divergent Sm fold in EDC3 proteins mediates DCP1 binding and P-body targeting." *Mol Cell Biol* **27**(24): 8600-8611.
- Trojan, E., R. P. Choudhury, et al. (2002). "Laser capture microdissection analysis of gene expression in macrophages from atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2234-2239.
- Tylor, S., A. Andonov, et al. (2009). "The SR-rich motif in SARS-CoV nucleocapsid protein is important for virus replication." *Can J Microbiol* **55**(3): 254-260.
- Ujike, M. and F. Taguchi (2015). "Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions." *Viruses* **7**(4): 1700-1725.
- Unterholzner, L. and E. Izaurralde (2004). "SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay." *Mol Cell* **16**(4): 587-596.
- Urano, F., X. Wang, et al. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." *Science* **287**(5453): 664-666.
- van Dijk, E., N. Cougot, et al. (2002). "Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures." *EMBO J* **21**(24): 6915-6924.
- VanLeuven, J. T., B. J. Ridenhour, et al. (2017). "Lung epithelial cells have virus-specific and shared gene expression responses to infection by diverse respiratory viruses." *PLoS One* **12**(6): e0178408.
- Vattem, K. M. and R. C. Wek (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11269-11274.
- Venkatagopalan, P., S. M. Daskalova, et al. (2015). "Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly." *Virology* **478**: 75-85.
- Ventura, J. J., A. Hubner, et al. (2006). "Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK." *Mol Cell* **21**(5): 701-710.
- Versteeg, G. A., P. S. van de Nes, et al. (2007). "The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations." *J Virol* **81**(20): 10981-10990.
- Wahle, E. and G. S. Winkler (2013). "RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes." *Biochim Biophys Acta* **1829**(6-7): 561-570.
- Wang, C., L. Deng, et al. (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." *Nature* **412**(6844): 346-351.
- Wang, X., Y. Liao, et al. (2009). "Inhibition of protein kinase R activation and upregulation of GADD34 expression play a synergistic role in facilitating coronavirus replication by maintaining de novo protein synthesis in virus-infected cells." *J Virol* **83**(23): 12462-12472.

- Ward, A. M., K. Bidet, et al. (2011). "Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures." *RNA Biol* **8**(6): 1173-1186.
- Weiss, C., S. Schneider, et al. (2003). "JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun." *EMBO J* **22**(14): 3686-3695.
- Wesche, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex." *Immunity* **7**(6): 837-847.
- Wesche, H., C. Korherr, et al. (1997). "The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases)." *J Biol Chem* **272**(12): 7727-7731.
- White, T. C., Z. Yi, et al. (2007). "Identification of mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein phosphorylation sites." *Virus Res* **126**(1-2): 139-148.
- Whitmarsh, A. J., J. Cavanagh, et al. (1998). "A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation." *Science* **281**(5383): 1671-1674.
- Wong, L. Y., P. Y. Lui, et al. (2016). "A molecular arms race between host innate antiviral response and emerging human coronaviruses." *Virol Sin* **31**(1): 12-23.
- Woo, P. C., S. K. Lau, et al. (2009). "Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping." *Exp Biol Med (Maywood)* **234**(10): 1117-1127.
- Wu, C. H., S. H. Yeh, et al. (2009). "Glycogen synthase kinase-3 regulates the phosphorylation of severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein and viral replication." *J Biol Chem* **284**(8): 5229-5239.
- Yang, Z., A. Jakymiw, et al. (2004). "GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation." *J Cell Sci* **117**(Pt 23): 5567-5578.
- Ye, H., J. R. Arron, et al. (2002). "Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling." *Nature* **418**(6896): 443-447.
- Yeager, C. L., R. A. Ashmun, et al. (1992). "Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E." *Nature* **357**(6377): 420-422.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell* **107**(7): 881-891.
- Yoshikawa, T., T. E. Hill, et al. (2010). "Dynamic innate immune responses of human bronchial epithelial cells to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection." *PLoS One* **5**(1): e8729.
- Yu, I. M., C. L. Gustafson, et al. (2005). "Recombinant severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein forms a dimer through its C-terminal domain." *J Biol Chem* **280**(24): 23280-23286.
- Yu, J. H., W. H. Yang, et al. (2005). "Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body." *RNA* **11**(12): 1795-1802.
- Yu, K., Z. Ming, et al. (2012). "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of nonstructural protein 2 (nsp2) from avian infectious bronchitis virus." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**(Pt 6): 716-719.
- Zhang, B., S. Kirov, et al. (2005). "WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts." *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue): W741-748.
- Zhang, L. K., F. Chai, et al. (2013). "Identification of host proteins involved in Japanese encephalitis virus infection by quantitative proteomics analysis." *J Proteome Res* **12**(6): 2666-2678.
- Zhang, Q. and D. Yoo (2016). "Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling." *Virus Res* **226**: 128-141.
- Zheng, D., N. Ezzeddine, et al. (2008). "Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells." *J Cell Biol* **182**(1): 89-101.
- Zhu, X., L. Fang, et al. (2017). "Porcine deltacoronavirus nsp5 inhibits interferon-beta production through the cleavage of NEMO." *Virology* **502**: 33-38.

- Zhu, X., D. Wang, et al. (2017). "Porcine Deltacoronavirus nsp5 Antagonizes Type I Interferon Signaling by Cleaving STAT2." *J Virol* **91**(10).
- Zolotukhin, A. S. and B. K. Felber (1999). "Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev." *J Virol* **73**(1): 120-127.
- Zumla, A., J. F. Chan, et al. (2016). "Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options." *Nat Rev Drug Discov* **15**(5): 327-347.

7.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Struktur des Virions und des Genoms verschiedener Coronaviren | 7 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Coronaviren | 9 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Achsen des ER Stress Signalweges | 14 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung des IL-1 Signalweges..... | 18 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der zellulären RNA Abbaumechanismen. | 20 |
| Abbildung 6: Beispieldarstellung einer HCoV-229E Titration und der Auswertung für die TCID ₅₀ /ml Berechnung..... | 55 |
| Abbildung 7: Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die <i>IL8</i> und <i>IL6</i> Genexpression in A549 Zellen mit Validierung der viralen Transkription | 70 |
| Abbildung 8: <i>Microarray</i> Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten Wirtsgenen in A549 Zellen im Vergleich mit IL-1a stimulierten Zellen | 71 |
| Abbildung 9: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in A549 Zellen nach einer 48-stündigen Infektion | 73 |
| Abbildung 10: Validierung der Infektionseffizienz in A549 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung | 75 |
| Abbildung 11: Isolation von infizierten A549 Zellen mittels Lasermikrodissektion (LMD) und anschließender RT-qPCR Analyse..... | 77 |
| Abbildung 12: <i>Microarray</i> Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten Wirtsgenen in A549 Zellen aus LMD isolierten Zellpopulationen..... | 78 |
| Abbildung 13: <i>Heatmap</i> zur Gegenüberstellung der <i>microarray</i> Ergebnisse der A549 Kinetik und des A549 LMD Experiments | 80 |
| Abbildung 14: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in A549 Zellen auf Basis des LMD Versuchs | 82 |
| Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus der A549 <i>microarray</i> Kinetik und dem A549 LMD <i>microarray</i> anhand des gemeinsam reguliert gefundenen KEGG Signalweges hsa04141 (<i>protein processing in endoplasmic reticulum</i>)..... | 83 |
| Abbildung 16: Die in A549 Zellen identifizierten HCoV-229E spezifisch deregulierten Zielgene werden auch in HuH7 Zellen induziert..... | 85 |
| Abbildung 17: <i>Heatmap</i> zur Gegenüberstellung der <i>microarray</i> Ergebnisse aus A549 und HuH7 Zellen .. | 88 |
| Abbildung 18: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in HuH7 Zellen im Vergleich mit IL-1a stimulierten Zellen .. | 89 |
| Abbildung 19: GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Komponenten und molekularen Funktionen in HuH7 Zellen im Vergleich mit IL-1a stimulierten Zellen | 90 |
| Abbildung 20: Grafische Darstellung aller mehr als 1,5-fach deregulierten Gene (log ₂) nach HCoV-229E Infektion oder IL-1a Stimulation | 91 |
| Abbildung 21: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von HCoV-229E und IL-1a spezifisch deregulierten zellulären Signalwegen und Prozessen in HuH7 Zellen | 93 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 22: KEGG und GO Analyse zur Identifikation von ausschließlich HCoV-229E spezifisch deregulierten zellulären Prozessen in HuH7 Zellen | 94 |
| Abbildung 23: Differenzielle Aktivierung des proinflammatorischen Signalweges durch HCoV-229E und IL-1a sowie der ER Stress Antwort durch HCoV-229E | 96 |
| Abbildung 24: Validierung der Infektionseffizienz und der p65 Translokation in HuH7 und HeLa Zellen nach HCoV-229E Infektion oder IL-1a Stimulation | 97 |
| Abbildung 25: Die shRNA vermittelte Suppression von p65 beeinflusst die virale Transkription sowie die transkriptionelle Regulation verschiedener HCoV-229E und IL-1a induzierter Wirtsgene..... | 99 |
| Abbildung 26: Die <i>single guide</i> RNA vermittelte Suppression von p65 beeinflusst ebenfalls die virale Transkription sowie die transkriptionelle Regulation verschiedener HCoV-229E und IL-1a induzierter Wirtsgene..... | 101 |
| Abbildung 27: Die shRNA vermittelte Suppression von TNFAIP3 beeinflusst die virale Replikation sowie die transkriptionelle Regulation verschiedener HCoV-229E und IL-1a induzierter Wirtsgene | 103 |
| Abbildung 28: Schematische Darstellung des Ablaufs einer markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung (LC-MS/MS) der Proteome von virusinfizierten Zellen..... | 106 |
| Abbildung 29: Die massenspektrometrische Analyse offenbarte eine Vielzahl von modifizierten Aminosäuren an viralen Proteinen | 108 |
| Abbildung 30: Phosphorylierungsspezifische Antikörpervalidierung für das virale N Protein an zwei Domänen mit unterschiedlichem Grad der Konservierung..... | 109 |
| Abbildung 31: Die inhibitorbasierte Hemmung des HCoV-229E induzierten PERK abhängigen ER Stress Signalweges führt zu einer schwächeren Phosphorylierung des viralen N Proteins im C-Terminus | 110 |
| Abbildung 32: Die inhibitorbasierte Hemmung der HCoV-229E induzierten Kinasen PERK, JNK und p38 führt zu einer veränderten Phosphorylierung des viralen N-Proteins im C-Terminus, sowie einer verringerten viralen Replikation | 111 |
| Abbildung 33: Die proteomweite Identifizierung von posttranslational modifizierten und unmodifizierten Peptiden in HCoV-229E infizierten HuH7 Zellen bestätigt die ursprünglichen <i>westernblot</i> Ergebnisse | 113 |
| Abbildung 34: Die identifizierten HCoV-229E regulierten posttranslational modifizierten- und unmodifizierten Proteine zeigen eine signifikante Anreicherung für KEGG Signalwege und für GO Kategorien aller drei Klassen | 115 |
| Abbildung 35: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorie <i>nuclear pore</i> | 117 |
| Abbildung 36: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorien <i>positiv regulation of viral genome replication</i> und <i>histone ubiquitination</i> | 119 |
| Abbildung 37: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorien <i>cytoplasmic mRNA processing body assembly</i> , sowie <i>histone H4-K5 acetylation</i> und <i>histone H4-K8 acetylation</i> | 121 |
| Abbildung 38: Die GO Analyse zeigte eine Anreicherung von posttranslational modifizierten Proteinen für die Kategorie <i>P-body</i> | 123 |
| Abbildung 39: Die Infektion mit HCoV-229E führt zum Verlust von <i>P-bodies</i> in A549, HeLa und HuH7 Zellen | 124 |
| Abbildung 40: Die Infektion mit HCoV-229E führt in A549, HeLa und HuH7 Zellen nicht zur Degradierung oder Induktion essentieller <i>P-body</i> Komponenten..... | 125 |
| Abbildung 41: Die Infektion mit HCoV-229E führt zu einer Dephosphorylierung von EDC4 an Serin 741 | 126 |
| Abbildung 42: Die EDC4 Phosphorylierung an Serin 741 hat im Zellkultursystem keine Relevanz für die Translation des viralen N Protein oder dessen Phosphorylierung an den Serinen 364/367 | 128 |
| Abbildung 43: Die EDC4 Phosphorylierung an Serin 741 hat keinen Einfluss auf die HA-EDC4 Lokalisierung in <i>P-bodies</i> | 129 |
| Abbildung 44: Die sgRNA vermittelte stabile Suppression von DCP1a, EDC4 und XRN1 beeinflusst die virale Translation vor allem bei einer niedrigen MOI..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 45: Die shRNA vermittelte Suppression von DCP1a verringert die virale Transkription und Translation in HeLa Zellen und beeinflusst die basale Expression von <i>IL8</i> | 132 |
| Abbildung 46: Die shRNA vermittelte Suppression von DCP1a verstärkt die virale Replikation in A549 Zellen und beeinflusst die Basale Expression von <i>IL8</i> | 133 |
| Abbildung 47: Die shRNA vermittelte Suppression von DCP1a beeinflusst die basalen und die IL-1a stimulierten Expressionslevel von <i>IL8</i> | 135 |
| Abbildung 48: Die gleichzeitige Überexpression von TRAF6 und JNK2 führt zu einer Hyperphosphorylierung von DCP1a | 136 |
| Abbildung 49: Die TRAF6 induzierte Phosphorylierung von DCP1a ist abhängig vom Verhältnis der beiden Proteine zueinander | 137 |
| Abbildung 50: Endogenes DCP1a wird TRAF6 abhängig ubiquitiniert | 138 |
| Abbildung 51: Die Deletion des C-Terminus von DCP1a und die Einführung der Mutationen L551R/ I555S/ F561R/ L565S verhindern die Trimerisierung dieser Mutanten | 140 |
| Abbildung 52: Abhängigkeit der TRAF:DCP1a Interaktion von der TRAF6 Aktivität | 141 |
| Abbildung 53: Eingrenzung der DCP1a Domäne für die TRAF6 Interaktion | 142 |
| Abbildung 54: Der C-Terminus von DCP1a stellt eine essentielle Domäne für die DCP1a Ubiquitinierung dar und die Trimerisierungskompetenz ist essentiell für die Phosphorylierung an S315..... | 143 |
| Abbildung 55: Die C-terminalen Mutationen in MYC-DCP1a beeinflussen dessen Lokalisation in <i>P-bodies</i> und dessen Phosphorylierung an Serin 315 | 145 |
| Abbildung 56: Grafische Zusammenfassung der durch eine HCoV-229E Infektion veränderten Wertsprozesse | 165 |
| Abbildung 57: Grafische Zusammenfassung der TRAF6 abhängigen Ubiquitinierung von DCP1a und dessen Relevanz für eine IL-1 abhängige DCP1a Phosphorylierung..... | 169 |

7.3 Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|--------|--|-------|---|
| °C | Grad Celsius | M | Molar |
| µl | Mikroliter | mA | Milliampere |
| µM | Mikromolar | min | Minute |
| µm | Mikrometer | miRNA | <i>micro ribonucleic acid</i> |
| Abb. | Abbildung | ml | Milliliter |
| Anh. | Anhang | mM | Millimolar |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat | mm | Millimeter |
| AS | Aminosäure | MP | Milchpulver |
| as | <i>antisense</i> | mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat | MS | Massenspektrometrie |
| bp | Basenpaare | n | Anzahl |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> | ng | Nanogramm |
| bzw. | beziehungsweise | nm | Nanometer |
| ca. | Zirka | NSP | <i>non structural protein</i> |
| Cas9 | <i>CRISPR associated protein 9</i> | qPCR | <i>quantitative polymerase chain reaction</i> |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure | PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| cm | Zentimeter | pmol | Pikomol |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> | pp | <i>polyprotein</i> |

| | | | |
|-------|--|--------------------|---|
| D | Asparaginsäure | PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| DAMP | <i>damage-associated molecular patterns</i> | R | Arginin |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> | RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | RNAi | <i>RNA interference</i> |
| DMV | <i>double membrane vesicle</i> | rpm | <i>rounds per minute</i> |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> | RT | Reverse Transkriptase |
| DPBS | <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> | RTC | <i>replication transcription complex</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | S | Serin |
| ER | <i>endoplasmic reticulum</i> | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ERAD | <i>endoplasmic reticulum associated protein degradation</i> | se | <i>Sense</i> |
| ERGIC | <i>endoplasmic reticulum to GOLGI intermediate compartment</i> | sgRNA | <i>small guide ribonucleic acid</i> |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> | subgRNA | <i>subgenomic ribonucleic acids</i> |
| g | Gramm/ Erdbeschleunigung | shRNA | <i>small hairpin ribonucleic acid</i> |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> | T | Tyrosin |
| gRNA | <i>genomic ribonucleic acid</i> | TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| h | Stunde | TCID ₅₀ | <i>tissue culture infectious dose 50%</i> |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> | TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| HEBS | <i>HEPES-buffered saline</i> | U | <i>Unit</i> |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> | u.a. | unter anderem |
| IB | Immunoblot | UPR | <i>unfolded protein response</i> |
| IF | Immunfluoreszenz | UTR | <i>untranslated region</i> |
| IgG | Immunglobulin G | V | Volt |
| l | Liter | wt | Wildtyp |
| LC | <i>liquid chromatography</i> | Y | Tyrosin |
| K | Lysin | z.B. | zum Beispiel |
| kDa | Kilodalton | | |

7.4 Portfolio

7.4.1 Publikationen

Tenekeci U, **Poppe M**, Beuerlein K, Buro C, Müller H, Weiser H, Kettner-Buhrow D, Porada K, Newel D, Xu M, Chen ZJ, Busch J, Schmitz ML, Kracht M. K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping. *Mol Cell*. Jun 2016 16;62(6):943-57. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.017

Poppe M, Wittig S, Jurida L, Bartkuhn M, Wilhelm J, Müller H, Beuerlein K, Karl N, Bhuju S, Ziebuhr J, Schmitz ML, Kracht M. The NF-κB-dependent and -independent transcriptome and

chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells. *PLOS Pathogens*. Mar 2017 13(3):e1006286. doi: 10.1371/journal.ppat.1006286.

7.4.2 Vorträge/Seminare

17.06.2013 Arbeitsgruppenseminar
19.09.2013 Institutsseminar
27.09.2013 Joint-lab-meeting AG Kracht / AG Schmitz / AG Borggreffe
29.11.2013 Arbeitsgruppenseminar
06.02.2014 Institutsseminar
17.03.2014 Arbeitsgruppenseminar
26.05.2014 Arbeitsgruppenseminar
06.06.2014 Joint-lab-meeting AG Kracht / AG Schmitz / AG Borggreffe
04.07.2014 Workshop CRC1021 (Immunfluoreszenztechniken)
15.12.2014 Arbeitsgruppenseminar
01.06.2015 Arbeitsgruppenseminar
26.06.2015 Fortschrittsbericht CRC1021
29.07.2015 Joint-lab-meeting AG Kracht / AG Schmitz / AG Borggreffe
07.12.2015 Arbeitsgruppenseminar
08.12.2015 Fortschrittsbericht AG Dammann
02.05.2016 Arbeitsgruppenseminar
12.12.2016 Arbeitsgruppenseminar
16.03.2017 Joint-lab-meeting AG Kracht / AG Schmitz / AG Borggreffe
23.06.2017 Fortschrittsbericht CRC1021

7.4.3 Betreute Masterstudenten

Name: Nina Hofmann
Thema: Entwicklung eines bioinformatischen *workflows* zur Untersuchung der genomischen Variabilität in Coronaviren.

7.5 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im Rudolf-Buchheim Institut für Pharmakologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für das interessante Thema, die regelmäßigen konstruktiven Gespräche und die tatkräftige Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Reinhard Dammann für die engagierte, fachbereichsinterne Betreuung sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kracht und des Rudolf-Buchheim Instituts für die angenehmen Atmosphäre, die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag sowie die vielen Ratschläge. Dabei möchte ich vor allem Sascha danken, mit dem ich dieses Projekt erst aufgebaut habe, sowie Christin und Ulas auf deren fachliche Unterstützung ich immer zählen konnte. Außerdem möchte ich mich bei Hendrik und Helmut bedanken, ohne deren technische Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich möchte ich meiner Familie für die Geduld, das Verständnis und die langjährige Unterstützung danken – allen voran meiner Frau Johanna, die mir täglich in allen Lebenslagen den Rücken stärkt, die diese Arbeit sorgfältig kontrolliert hat und ohne die ich mir mein Leben nicht mehr vorstellen kann.